

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**COOPERACIÓN FUNCIONAL ENTRE LOS GENES
SUPRESORES TUMORALES RB Y TRP53 EN
EPIDEMIA DE RATÓN.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Ana Belén Martínez Cruz

Bajo la dirección de los doctores

Jesús M^a Paramio González
Mirentxu Santos Lafuente

Madrid, 2010

- ISBN: 978-84-693-1273-5

Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Ciencias Biológicas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I

TESIS DOCTORAL

**Cooperación funcional entre los genes
supresores tumorales *Rb* y *Trp53* en
epidermis de ratón**

Ana Belén Martínez Cruz
Madrid, 2009

Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Ciencias Biológicas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I

TESIS DOCTORAL

**Cooperación funcional entre los genes
supresores tumorales *Rb* y *Trp53* en
epidermis de ratón**

Vº Bº directores de tesis

Jesús M^a Paramio González

Mirentxu Santos Lafuente

Ana Belén Martínez Cruz
Madrid, 2009

**El trabajo experimental presentado en esta memoria ha sido realizado en la División
de Biomedicina Epitelial del Centro de Investigaciones Energéticas,
Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT), bajo la dirección del Dr. Jesús M^a
Paramio González y la Dra. Mirentxu Santos Lafuente**

A mis padres y hermano.

A Raúl.

Como la selección natural obra solamente por acumulación de variaciones favorables, pequeñas y sucesivas, no puede producir modificaciones grandes o súbitas; puede obrar solamente a pasos cortos y lentos.

...

Podemos comprender por qué, en toda la naturaleza, el mismo fin general se consigue por una variedad casi infinita de medios, pues toda particularidad, una vez adquirida, se hereda durante mucho tiempo, y conformaciones modificadas ya de modos muy diferentes tienen que adaptarse a un mismo fin general.

El origen de las especies

Charles Darwin (1809-1882)

2009, bicentenario de su nacimiento

Este trabajo no existiría sin haber contado con la ayuda y el apoyo de compañeros, amigos y familiares que siempre han estado ahí, acompañándome fielmente durante esta etapa. Para ellos, estos párrafos y toda la tesis...

En primer lugar, mis más sinceros agradecimientos a mis directores de tesis Jesús M^a Paramio y Mirentxu Santos. Jesús, gracias por tu paciencia, tu confianza en mí y tu cariño. Gracias por todo. Porque esta tesis es tuya por entero, porque sabes que no tengo palabras para agradecerte lo mucho que has hecho para que esto salga adelante. De verdad que ha sido un placer contar con una persona como tú y no pararé de repetírtelo nunca. Miren, por la complicidad que he alcanzado contigo, por saber entenderme y ponerte en mi lugar, por toda tu ayuda desde mis comienzos hasta el final de este trabajo. Ya sabéis que siempre digo gracias, pero esta vez os lo diría millones de veces.

A Jose Luis Jorcano, director de la división de epitelios, el equipo en el que he trabajado durante estos últimos años y donde ha sido posible la realización de esta tesis.

A todos los compañeros de mi grupo; Carmen, los comienzos a tu lado me ayudaron muchísimo. Tú me enseñaste los primeros pasitos con los animales. Y siempre estás dispuesta a echarme un cable, a escucharme, a estar de mi lado. ¡Nos quedaron tantas cosas pendientes por hacer juntas! Gracias por saber que siempre podré contar contigo. Ramón, por ser un compañero tan estupendo, divertido, cómplice... todo lo que diga es poco de ti. Por tus conocimientos y la forma de transmitirlos (ya sabes que eres mi docente favorito). Por tus historias y los buenos ratos que nos haces pasar. Te deseo lo mejor en todos los aspectos de tu vida, en lo laboral y en lo personal. Aunque sé que ahora eres del todo feliz. Disfrútalo. Corina, por toda tu ayuda en tantas y tantas ocasiones, por saber darle siempre explicación a las cosas con tan buen criterio y aclarar así todo tipo de dudas. Por tu trato agradable, siempre con tan buena predisposición. Da gusto contar con personas como tú en el grupo. M^a Fer, ya no estás por aquí, pero yo te sigo sintiendo a mi lado, se quedó tu esencia entre nosotros. Ya sabes lo especial que eres para mí, desde que nos conocimos conectamos de una forma asombrosa y la amistad que tenemos no tiene fronteras por muy lejos que estés. Gracias por tu ayuda, tus ánimos y tu confianza. Y gracias por Alicia, ¡que sobri más preciosa que tengo! Marta, tampoco estás por aquí aunque a ti te tengo más cerca. Gracias por ser la primera que me inició en el cacharreo del laboratorio. Y por los ánimos durante la escritura, ¡conectadas vía mail para darnos fuerzas mutuas! Te deseo toda la suerte en lo que estás emprendiendo, con el tesón que le pones llegarás muy lejos. A mis nenas, Cloti, Águeda y Cristina. ¿Qué os puedo decir? Escribiría una tesis más sólo para vosotras, por vuestra amistad, compañerismo, camaradería

y tantos buenos ratos... ¡Tengo tanta suerte de teneros cerca de mí! Cloti, heredera de los conocimientos de la vieja escuela, espero estar a tu lado durante toda tu andadura. Eres la mejor compañera subgrupal que he podido tener y sin ti el día a día del laboratorio no sería igual. Al final, andaluces y gallegos se pueden entender a las mil maravillas, ¡nosotras lo hemos comprobado y no es tan difícil! Águeda, no pierdas nunca esas ganas de reír que nos contagian a todos. Necesitamos de tu alegría para tirar para adelante. Y de tu bondad, no he visto a nadie más bueno como tú. No cambies nunca. Ojalá puedas ensayar conmigo tu tesis tanto como el DEA. Cristi, almas gemelas, eso es lo que somos tú y yo por todas las cosas que nos hacen reír, no entendidas por el resto... nuestro mundo es único, siempre a nuestra disposición para echar unas risas. Que la tuya no se pierda nunca. Ni el ánimo ni el tesón que te caracterizan. Me alegra tanto que tu nombre se escriba con "c"... Y a mi niño, "er Jose", el torbellino cordobés que vino a revolucionarnos a todos. ¡Qué majo eres mi alma! Y no es exageración... Eres de un apaño que no es normal. Te deseo toda la suerte del mundo en todo lo que te propongas, aunque, nene, ¡tú vas a triunfar! Marta, has llegado hace poco pero parece que llevas toda una vida aquí con nosotros. Tu dulzura, tu bondad y tu generosidad son tan grandes... Eres de las personas que vale la pena conocer y estamos encantados de que se nos haya brindado esa posibilidad. Ya falta menos para que se hagan tus sueños realidad. Cuenta con nosotros para compartirlos contigo. A Ana y Guille, por vuestro entusiasmo y ánimo durante el tiempo que estuvisteis entre nosotros. Os merecéis todo lo mejor.

Al resto de compañeros del laboratorio, ¡sois tantos que espero no dejarme a ninguno! Jose, compañera crepuscular, ¿qué será de nosotras ahora? No sabes lo genial que eres, esa presencia, ese saber estar... ¡si es que lo tienes todo! Ya sabes lo indispensable que eres para nosotras cuando estamos perdidas mirando la carta de un bar... En serio, eres una persona estupenda con la que siempre se puede contar. David, compañero de fatigas, siempre estás en tu esquinita haciéndome compañía por las noches. Gracias por tu tranquilidad, tu aplomo, por ser una persona tan especial. Espero que nos sigamos dejando muchos libros, quedan millones por leer. Laura, ¡eres una más del grupo! Tus visitas siempre son tan agradables... Y vamos de la mano en esto, ¡tú eres la siguiente! Te mando toda la energía positiva para que la cosa vaya genial, seguro que es así, porque tú vales mucho. Rita, por compartir tantas aficiones contigo. Por introducirnos en el apasionante mundo de los cortos. Sólo una pregunta: "Who watches the watchmen?". A todas las niñas de terapia por lo mucho que me habéis ayudado y animado: Marta G, ¡eres adorable!, Blanca, siempre con esa sonrisa y amabilidad, Lucía y Sara, mucho ánimo con vuestras tesis, ¡vosotras podéis con esto y con mucho más! Marta C, Almu, M^a Ajo,

Nati, Carol, Nuria, Luisa... a todas de verdad muchísimas gracias por toda la ayuda y por vuestra simpatía. A Isa y a Rodolfo, por ser tan buenos compañeros el tiempo que estuvimos juntos. Espero poder veros en mi tesis, daros un gran abrazo y desearos lo mejor. A Sole por su inestimable ayuda, siempre que te necesito estás ahí y todos los problemas desaparecen. ¡Que Calisto no nos abandone nunca! A Juanma, factor importante en el apoyo técnico. A Pilar por tantas y tantas histologías. A Isabel por ser una madre para todos nosotros, ¡asiento reservado en mi tesis! A Quico, por su simpatía y por tantas conversaciones interesantes.

A todo el resto de compañeros de la planta de abajo. Rubén, (¿afirmas o preguntas?), Manuel (me encanta la mesa antivibraciones del nanodrop), Rodolfo, Ángel (¿otra carrera?), Llanos, Fernando y Marcela, muchas gracias a todos por vuestros conocimientos y ayuda. A Angus en especial por sus ánimos y sus consejos.

A Elena, Aurora, Sergio y Angelines, ¡qué equipo más bueno que formáis! Por ser tan agradables, pacientes y resolutivos. Estamos encantados con todos vosotros.

A Jesús y Edi, por su buen humor y toda la ayuda con los ratones. A todas las chicas del animalario por hacer que el trabajo allí sea más llevadero.

A toda la piña hematopoyética. A Alberto y Javi, por ser unos compañeros estupendos dentro y fuera del laboratorio, sois geniales. Gracias a Paula y Marina por su gran ayuda en micros e inflamación. A Afri y M^a Eugenia por toda la ayuda pre-tesis. A Miguel, mi heavy favorito, por tantos y tantos CDs (¡qué chulo el de Extreme!). A Laura, Elena, Juan, Óscar, Guille, Maru, Esther, María, Antonio, M^a Luz, Álvaro... ¡y aún me falta mucha gente! A todos mil gracias.

Al laboratorio de Felipe Prósper en el CIMA. En especial a Xabi, muchísimas gracias por tu gran ayuda y por hacernos sentir tan a gusto con vosotros. A Leire, Amaia, Edurne, Lucía, Juana... a todos por ser tan buenos compañeros, ¡prometemos visitaros en San Fermín!

A mis compañeros máster, por ese año tan maravilloso que pasamos juntos en una de las ciudades más bonitas del mundo. Marian, Juana, Imane, Hicham, Mohamed, Nuria, Monsef, Martín... a todos os doy las gracias por vuestra amistad y por tantos buenos ratos. Ojalá podamos vernos pronto allá abajo. Cádiz, su gente, su arte y su moscatel; siempre te tendremos en la memoria. Amorina, qué alegría tenerte en Madrid. Pocos meses de convivencia se han convertido en una bonita amistad. ¡Tengo que visitar a Gato en breve!

A mis compañeras de piso en Granada. Por esos años de convivencia, confidencias y amistad que compartí con vosotras. Eli, por tu dulzura y por el cariño que nos tenemos aunque nos veamos tan poquito, ¡en agosto tenemos una cita en Ronda! Encarna, por tus ánimos

incondicionales, siempre con palabras alentadoras que me han dado tanta fuerza. Has sido nuestro ejemplo en todo y te mereces lo mejor. Susana, mi fiel compañera durante tanto tiempo, contigo he compartido alegrías, penas y risas. La próxima tesis es la tuya, verás que al final todo sale con éxito. Espero estar a tu lado cuando llegue el día y darte todo mi apoyo. Estoy deseando ver a Zoe para darle un achuchón y ver cómo anda de canas. Qué suerte haber disfrutado de ella, ¡ya sabes lo que la adoro!

A mis compañeros de piso de Madrid. Mª Fer, me diste la oportunidad de usar tu habitación vacía y ¡ahí que me quedé! Gracias por ser una compañera tan estupenda y tan buena amiga fuera del laboratorio. Nunca nos cansamos de estar tanto tiempo juntas, ¿verdad? Inés, una serie de casualidades nos hicieron encontrarnos en Madrid y nuestra amistad es ya para toda la vida. Eres una persona muy especial para mí, por la compenetración que tengo contigo, porque pensamos igual de tantas cosas, porque has sido mi mejor apoyo y mi balsa de tranquilidad en el piso. Ya sabes que te deseo todo lo mejor porque te lo mereces, tú vales mucho, lo sé. Y siempre estaré a tu lado cuando lo necesites, ¡aún queda para que te hartes de mí! Joana, primor de los primores, nunca pensamos que esa mañana de doctorado fuese a darnos la oportunidad de conocer a una persona tan maravillosa como tú. Tu alegría, tu forma de ser y tu animosidad nos han dejado prendadas. Por tus miles de historias, consejos y cariño, por todas las pequeñas cosas que nos ofreces, las sonrisas, los besos, los abrazos... has dejado un vacío en casa y en nuestros corazones, pero sabemos que te tenemos siempre muy, muy cerca. A Nici, por tu dulzura y tu tranquilidad, pasamos unos meses geniales contigo. Porque para ti “todo cositas es bien” y siempre nos arrancabas una sonrisa. A Javi, nuestro rubio favorito, eres el compañero perfecto. Con tu sonrisa de buenos días, tus mimos y tu cariño ¡haces que la convivencia sea tan fácil! Por tu gran invento de las curry nights dentro o fuera de casa. De verdad que es una alegría tenerte con nosotras. Sabiendo que estás ahí, todo es más llevadero.

A mis amigas Aurora, Caro y Mari Carmen. Por tantos años juntas, y los que nos queden, que espero sea toda la vida. Por todas las cosas que nos quedan por vivir, momentos muy especiales que espero nos unan a las cuatro de nuevo como hace años. Porque no vale la pena mirar hacia el pasado cuando hay un futuro tan prometedor compartiendo nuestra amistad. Gracias por estar siempre a mi lado ¡Linares no es lo mismo sin vosotras!

A mis padres y hermano por dármelo todo, por ser para mí el mayor orgullo, por el apoyo incondicional en todo lo que me he propuesto. Porque los pequeños logros de mi vida son para vosotros, los he conseguido gracias a vuestro esfuerzo y a vuestro cariño. A mi padre, por esas palabras de aliento que me han dado confianza y seguridad para seguir adelante. A mi

madre por su cariño, su ternura y sus besos que me hacen tanto bien. A los dos por los valores que me habéis inculcado y por vuestro amor incondicional. Todo lo que soy os lo debo a vosotros. A mi hermano Jesús, por ser la persona que más admiro en el mundo. Porque con el paso de los años he encontrado en ti a una de las personas más importantes de mi vida. Has sido mi ejemplo en todo y he aprendido muchísimo de ti. Porque sé que te tengo siempre a mi lado cuando te necesite, para que me hagas reír, para que despejes mi cabeza de preocupaciones, siempre tendrás miles de historias para hacerlo. A Tati, por tu entusiasmo, tu alegría y lo estupenda que eres. Por formar parte de nuestra familia y querer tanto a mi hermano. Por haberte tenido un tiempo cerquita de mí y contar contigo para tantas cosas...

A Tere, Rafa, Sheila, Rubén, Paqui... por haberos convertido en algo muy especial para mí. Tengo mucha suerte de contar con vuestro cariño.

A Raúl, la persona a la que le debo todo mi entusiasmo en el camino que he emprendido. Porque el entrar en este mundo fue gracias a ti. Y el mantenerme en él ha sido porque nunca has dudado en que valgo para todo lo que me proponga. Creo que te lo he demostrado. Este esfuerzo lo he hecho por entero por ti, porque sé que te importo, y mucho. Son muchos años juntos y contigo he encontrado un consuelo y una seguridad en mi vida que dudo mucho podría tener si no estuvieras a mi lado. Por eso lo nuestro ha valido y vale la pena. ¡Tu cariño me ayuda tanto! Y espero que dure mucho, mucho tiempo sea donde sea. Seguiremos luchando juntos por ello. Paso a paso y día a día...

Abreviaturas

ΔCE	Deleción condicional en epidermis.
ADN	Ácido DesoxirriboNucleico.
ADNc	Ácido DesoxirriboNucleico complementario.
Akt	Serina-treonina quinasa, del retrovirus Akt 8.
ANOVA	Del inglés, <i>analysis of variance</i> . Análisis de varianza.
ARN	Ácido RiboNucleico.
ARNm	Ácido RiboNucleico mensajero.
Bax	Del inglés, <i>Bcl2-associated x protein</i> . Proteína x asociada a Bcl2.
BCC	Del inglés, <i>Basal Cell Carcinoma</i> . Carcinoma de células basales.
Bcl2	Del inglés, <i>B-cell lymphoma 2</i> .
BrdU	Bromo-deoxiUridina.
BSA	Del inglés, <i>Bovine Serum Albumine</i> . Seroalbúmina bovina.
CDK	Del inglés, <i>Cycling-Dependent Kinases</i> . Quinasas dependientes de ciclinas.
CEEA	Comité de Ética de Experimentación Animal.
Chk	Del inglés, <i>Checkpoint Kinase</i> . Quinasa del punto de control mitótico.
CKI	Del inglés, <i>Cycling-Dependent Kinases Inhibitors</i> . Inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas.
Cyc	Del inglés, <i>Cycling</i> . Ciclina.
DAB	DiAminoBencidina.
DAPI	Del inglés, <i>4, 6 DiAmidin-2-Phenyl-Indole</i> , 4,6 diamidino-2-fenil-indol.
DAVID	Del inglés, <i>Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery</i> . Base de datos de anotación, visualización y descubrimientos integrados.
DBD	Del inglés, <i>DNA-Binding Domain</i> . Dominio de unión al ADN.
DMBA	7, 12-DiMetilBenz(a) Antraceno.
dNTP	Del inglés, <i>deoxiNucleotidil TriPhosphate</i> . Deoxinucleotidil trifosfato.
dUTP	Del inglés, <i>deoxiUridine TriPhosphate</i> . Deoxuridina trifosfato.
EDTA	Etilén-diamino-tetra-acetato.
EGFR	Del inglés, <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> . Receptor del factor de crecimiento epidérmico.
EGTA	Etilén-glicol-tetra-acetato.
ERK	Del inglés, <i>extracellular signal- regulated kinase</i> . Quinasa regulada por señal extracelular.
FDG	2- ¹⁸ F-fluoro-2-deoxi-D-glucosa.
FITC	Del inglés, <i>Fluorescein IsoThiCyanate</i> . Isotiocianato de fluoresceína.
GEPAS	Del inglés, <i>Gene Expression Profile Analysis Suite</i> . Herramienta de análisis del perfil de expresión génica.

GSEA	Del inglés, <i>Gene Set Enrichment Analysis</i> . Análisis de enriquecimiento del set de genes.
Hepes	Del inglés, <i>N2-HydroxyEthylPiperazine-N'-2-EthaneSulphonic acid</i> . Ácido N2-hidroxietilpiperacín-N'-2-etanosulfónico.
H&E	Hematoxilina/Eosina.
H-ras	Del inglés, <i>Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog</i> .
HPV	Del inglés, <i>Human Papiloma Virus</i> . Virus de papiloma humano.
IFN-1	Del inglés, <i>Interferon type 1</i> . Interferón 1.
IGF	Del inglés, <i>insulin-like growth factor</i> . Factor de crecimiento de la insulina.
IKK	Del inglés, <i>IκB Kinase</i> . Quinasa IκB.
IL	Del inglés <i>Interleukin</i> . Interleuquina.
INK4	Del inglés, <i>Inhibitors of Cyclin dependent kinases 4</i> . Locus que codifica inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas.
K	Del inglés, <i>Keratin</i> . Queratina.
K-ras	Del inglés, <i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i> .
LRC	Del inglés, <i>Label Retaining Cells</i> . Células que retienen el marcaje.
MCM	Del inglés, <i>Molecular Concept Map</i> . Mapa de conceptos moleculares.
Mdm2	Del inglés, <i>murine double minute 2</i> .
MdmX	Del inglés, <i>murine double minute X</i> .
MEK	Del inglés, <i>mitogen-activated protein kinase</i> . Proteín quinasa activada por mitógenos.
miRISC	Del inglés, <i>miRNA-induced silencing complex</i> Complejo de silenciamiento inducido por microARN.
MOE	Del inglés, <i>Mouse Expression</i> . Expresión de ratón.
NCBI	Del inglés, <i>National Center for Biotechnology Information</i> .
N-ras	Del inglés, <i>neuroblastoma rat sarcoma viral oncogene homolog</i> .
NFκB	Del inglés, <i>Nuclear Factor κ B</i> . Factor nuclear κ B.
OCT	Del inglés, <i>Optimal Cutting Temperature</i> . Temperatura óptima de corte.
OD	Del inglés, <i>oligomerization domain</i> . Dominio de oligomerización.
p19Arf	Del inglés, <i>p19-alternate reading frame</i> . Marco de lectura alternativo p19.
PAGE	Del inglés, <i>PolyAcrilamide Gel Electrophoresis</i> . Electroforesis en gel de poliacrilamida.
PBS	Del inglés, <i>Phosphate Buffered Saline</i> . Tampón fosfato salino.
PCNA	Del inglés, <i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i> . Antígeno nuclear asociado a células proliferativas.
PCR	Del inglés, <i>Polymerase Chain Reaction</i> . Reacción en cadena de la polimerasa.
PDGF	Del inglés, <i>Platelet-derived growth factor</i> . Factor de crecimiento derivado de plaquetas.

PECAM	Del inglés, <u>P</u> latelet/ <u>e</u> ndothelial <u>c</u> ell <u>a</u> dhesion <u>m</u> olecule.
PET	Del inglés, <u>P</u> ositron <u>e</u> mission <u>t</u> omography. Tomografía de emisión de positrones.
PTEN	Del inglés, <u>P</u> hosphatase and <u>t</u> ensin homolog deleted on chromosome <u>ten</u> . Fosfatasa homóloga de la tensina delecionada del cromosoma 10.
PI3K	Del inglés, <u>P</u> hospho <u>I</u> nositol <u>3</u> <u>K</u> inase. Fosfoinositol 3 quinasa.
PMSF	Del inglés, <u>P</u> henyl <u>M</u> ethyl <u>S</u> ulfonyl <u>F</u> luoride, Fenil-Metil-Sulfonil-Fluoruro.
pRb	Proteína del retinoblastoma
PTM	Del inglés, <u>P</u> avlidis' <u>T</u> emplate <u>M</u> atching.
RMA	Del inglés, <u>R</u> obust <u>M</u> ulti-array <u>A</u> verage.
SAM	Del inglés, <u>S</u> ignificance <u>A</u> nalysis of <u>M</u> icroarrays.
SCC	Del inglés, <u>S</u> quamous <u>C</u> ell <u>C</u> arcinoma. Carcinoma escamoso.
SCLC	Del inglés, <u>S</u> mall <u>C</u> ell <u>L</u> ung <u>C</u> arcinoma. Carcinoma de células pequeñas de pulmón.
SDS	Del inglés, <u>S</u> odium <u>D</u> odecyl- <u>S</u> ulphate. Dodecil sulfato sódico.
Stat3	Del inglés, <u>S</u> ignal <u>t</u> ransducer and <u>a</u> ctivator of <u>t</u> ranscription <u>3</u> .
SV40	Del inglés, <u>S</u> imian <u>v</u> acuolating <u>v</u> irus <u>40</u> .
TAD	Del inglés, <u>t</u> rans <u>a</u> ctivation <u>d</u> omain. Dominio de transactivación.
TBE	Del inglés, <u>T</u> ris- <u>B</u> orate- <u>E</u> DTA, Tris-borato-EDTA.
TBS	Del inglés, <u>T</u> ris <u>B</u> uffered <u>S</u> aline, Tampón Tris salino.
TdT	Del inglés, <u>T</u> erminal <u>d</u> eoxinucleotidil <u>T</u> ransferase. Transferasa terminal de nucleótidos.
TE	<u>T</u> ris- <u>E</u> DTA
TEM	<u>T</u> ransición epitelio- <u>m</u> esénquima.
TGF	Del inglés, <u>T</u> umor <u>G</u> rowth <u>F</u> actor. Factor de crecimiento tumoral.
TME	<u>T</u> ransición <u>m</u> esénquima-epitelio.
TNF- α	Del inglés, <u>T</u> umoral <u>N</u> ecrosis <u>F</u> actor, Factor de necrosis tumoral.
Trp53	Del inglés, <u>T</u> umor <u>p</u> rotein <u>53</u> . Nombre del gen en humano.
TPA	Del inglés, <u>12-O-Tetradecanoil-Phorbol-13-Acetate</u> , 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato.
TPM	<u>T</u> ropomiosina.
Tris	<u>T</u> ris-(hidroximetil)-aminometano.
Trp53	Del inglés, <u>T</u> ransformation <u>r</u> elated <u>p</u> rotein <u>53</u> . Nombre del gen en ratón.
TSP	Del inglés, <u>T</u> rombospondin. Trombospondina
TUNEL	Del inglés, <u>TdT-mediated dUTP Nick End Labeling</u> . Marcaje de extremos con dUTP mediado por la enzima TdT.
UCM	<u>U</u> niversidad <u>C</u> omplutense de <u>M</u> adrid.
V	<u>V</u> oltios.

VEGF	Del inglés, <i><u>V</u>ascular <u>E</u>ndotelial <u>G</u>rowth <u>F</u>actor</i> . Factor de crecimiento de endotelio vascular.
VPF	Del inglés, <i><u>V</u>ascular <u>P</u>ermeability <u>F</u>actor</i> . Factor de permeabilidad vascular.
Wnt	Del inglés, <i><u>W</u>ingless/<u>I</u>nt</i> , Vía de Wingless/Int

Índice

Introducción.....	1
1. Cáncer.....	1
2. La piel.....	2
2.1. La epidermis de ratón como sistema modelo.....	5
3. Tumorigénesis en la piel.....	5
3. 1. Células madre epidérmicas.....	7
3. 2. Células madre del cáncer.....	9
3. 3. Modelo de carcinogénesis química en epidermis.....	11
3. 4. Inflamación y carcinogénesis epitelial.....	12
3. 5. Transición epitelio-mesénquima y metástasis.....	13
3. 6. La angiogénesis en el desarrollo tumoral.....	18
3. 7. MicroARNs y cáncer.....	21
4. pRb. Implicación en el ciclo celular y su papel como supresor tumoral.....	25
5. p53. Implicación en ciclo celular y apoptosis. Papel como supresor tumoral.....	27
6. Interacción funcional entre pRb y p53 en la supresión tumoral.....	30
7. Modelos animales para el estudio de <i>Rb</i> y <i>Trp53</i> en epidermis y en cáncer.....	31
 Objetivos.....	 35
 Materiales y métodos.....	 37
1. Animales de experimentación.....	37
2. Extracción de ADN genómico.....	37
3. Genotipado de animales.....	38
4. Análisis histológico e inmunohistoquímico.....	39
5. Incorporación de BrdU <i>in vivo</i>	41

6. Detección de muerte celular mediante TUNEL.....	41
7. Western blot.....	42
8. Aislamiento de ARN total y microARN de pieles y tumores.....	43
9. Análisis de expresión génica y de microARN.....	44
10. PCR a tiempo real de microARN.....	47
11. Análisis por PET.....	47

Resultados.....49

1. Consecuencias fenotípicas de la deficiencia de p53 y de pRb y p53 en la epidermis de ratón.....49

1. 1. Caracterización fenotípica de la epidermis deficiente en p53 y en pRb y p53.....	49
1. 2. Proliferación en la epidermis deficiente en p53 y en pRb y p53.....	51

2. Carcinomas escamosos inducidos por la inactivación somática de *Trp53* y de *Rb* y *Trp53*.....52

2. 1. Tumorigénesis espontánea en los ratones deficientes en p53 y en pRb y p53 en epidermis.....	52
2. 2. Posibles efectos provocados por la ausencia de p53 en la epidermis de los animales <i>Trp53</i> ^{ΔCE}	54
2. 2. 1. Alteraciones en el ciclo del pelo.....	54
2. 2. 2. Procesos inflamatorios en la epidermis y en los tumores.....	55
2. 2. 3. Mitosis aberrantes y amplificación centrosómica en epidermis y tumores.....	59
2. 3. Desarrollo, caracterización y origen folicular de los tumores.....	65
2. 4. Análisis de apoptosis en estados tempranos y avanzados de los tumores.....	67
2. 5. Estudios de proliferación en folículos displásicos y en estados tempranos y avanzados de los tumores.....	69

2. 6. Análisis de crecimiento de los tumores deficientes en p53 y en pRb y p53.....	71
2. 7. Mecanismos moleculares de la cooperación funcional entre pRb y p53.....	72
2. 7. 1. Incremento de actividad de Akt en los tumores deficientes en pRb y p53.....	72
2. 7. 2. Incremento de la respuesta angiogénica en los tumores deficientes en pRb y p53.....	75
2. 8. Análisis de expresión génica de tumores <i>Trp53^{ΔCE}</i> y <i>Rb^{ΔCE},Trp53^{ΔCE}</i> . Comparación génica con tumores humanos y con firmas de células madre embrionarias humanas.....	78
2. 8. 1. Obtención de una firma génica a partir de los tumores murinos deficientes en p53 capaz de clasificar pacientes de cánceres humanos en grupos de mal o buen pronóstico.....	79
2. 8. 2. Comparación entre la firma génica obtenida de los tumores murinos deficientes en p53 con firmas génicas de cáncer humano con mutaciones en <i>Tp53</i>	81
2. 8. 3. Comparación entre la firma génica obtenida de los tumores murinos deficientes en p53 con firmas génicas de cáncer humano de mal pronóstico.....	81
2. 8. 4. Enriquecimiento de los tumores murinos deficientes en p53 en genes propios de células madre humanas.....	82
 3. Transición epitelio-mesénquima (TEM) y metástasis de los tumores.....	85
3. 1. Análisis de la proporción de carcinomas de células fusiformes en animales deficientes en p53 y en pRb y p53.....	85
3. 2. Proceso de TEM en los tumores deficientes en p53.....	86
3. 3. Formación de metástasis en pulmón tras el desarrollo tumoral en animales deficientes en p53.....	90
3. 4. Implicación de los microARNs en TEM y metástasis.....	92
 Discusión.....	99

1. <i>Rb</i> y <i>Trp53</i> en la supresión tumoral.....	99
2. Fenotipo en epidermis de los animales <i>Trp53</i> ^{ΔCE} y <i>Rb</i> ^{ΔCE} ; <i>Trp53</i> ^{ΔCE}	100
3. La deficiencia en p53 en epidermis conduce al desarrollo de tumores espontáneos.....	102
4. Cooperación funcional entre pRb y p53 en la tumorigénesis epidérmica.....	107
5. Los tumores murinos presentan características de expresión génica similares a tumores humanos malignos.....	110
6. Los tumores murinos sufren procesos de TEM y metástasis por medio de mecanismos mediados por microARNs.....	112
7. Aplicación terapéutica de los modelos murinos <i>Trp53</i> ^{ΔCE} y <i>Rb</i> ^{ΔCE} ; <i>Trp53</i> ^{ΔCE}	115
 Conclusiones	117
 Bibliografía	119
 Anexo	137

Introducción

1. Cáncer

En los organismos pluricelulares, el crecimiento y la proliferación celular son procesos sometidos a un control estricto y complejo que depende de las necesidades del organismo, y cuyo objetivo es mantener el equilibrio entre proliferación, diferenciación y muerte celular. En general, las alteraciones en este equilibrio conducen a situaciones patológicas entre las que se encuentra el cáncer. Se conoce como cáncer al conjunto de diferentes enfermedades caracterizadas por un ciclo celular descontrolado y una proliferación excesiva de las células. Esto originará inicialmente la formación de un tumor primario. Posteriormente, estas células pueden adquirir una capacidad invasiva que les permitirá escapar de su localización natural y colonizar y proliferar en otros tejidos u órganos en el organismo produciendo metástasis. El desarrollo tumoral es una sucesión de múltiples pasos en los que se producen ciertas alteraciones genéticas que conducen a la progresiva transformación de células normales a malignas. Estas alteraciones confieren a las células tumorales una serie de características que permitirán el progresivo desarrollo del cáncer. Se dice por tanto que los procesos carcinogénicos son secuenciales o en etapas (Hanahan y Weinberg, 2000).

El origen del cáncer tiene lugar a partir de la acumulación de sucesivas mutaciones. Los genes relacionados con el desarrollo tumoral están implicados en procesos que activan o reprimen el avance del ciclo celular, participan en procesos de reparación de daños en el ADN y/o modulan el proceso de muerte celular programada o apoptosis. Estos genes pueden ser de tres tipos fundamentales: proto-oncogenes, genes supresores de tumores y genes de reparación de ADN (Vogelstein y Kinzler, 2004). Los proto-oncogenes están generalmente implicados en rutas de señalización celular relacionadas con procesos de proliferación y/o apoptosis. Sus formas mutadas, denominadas oncogenes, presentan un comportamiento dominante, es decir, la mera presencia de uno de sus dos alelos genera alteraciones en la célula. En algunos casos, la mera amplificación génica de los proto-oncogenes, sin necesidad de mutaciones, puede ser suficiente para promover la transformación celular al producir una señalización “excesiva”. Los genes supresores de tumores, por el contrario, evitan un crecimiento

celular excesivo y presentan un comportamiento recesivo, siendo precisa la alteración de sus dos alelos para producir la pérdida de función y la consecuente alteración patológica. Para algunos genes supresores se produce el fenómeno de haploinsuficiencia por el que sólo es necesaria la pérdida de uno de los dos alelos del gen para inactivar su función (Santarosa y Ashworth, 2004). En cuanto a los genes de reparación del ADN, éstos corrigen los errores que se producen durante el proceso de replicación o daños producidos por agentes físicos y químicos, por lo que la pérdida de su función puede provocar procesos patológicos. Las mutaciones producidas tanto en oncogenes como en genes supresores de tumores conducen a una inestabilidad genética que favorece el desarrollo tumoral. Las alteraciones del material genético en las células transformadas pueden ser heredadas, adquiridas durante la replicación del ADN, o como consecuencia del efecto de infecciones, radiaciones o carcinógenos químicos procedentes de la industria, tabaco, contaminación, etc. Nuevos aspectos de la genética del cáncer como son la metilación del ADN y el papel de los microARNs, están siendo ampliamente estudiados en la actualidad como importantes factores a tener en cuenta durante el proceso de carcinogénesis (Esteller y Herman, 2002; Gartel y Kandel, 2008).

En nuestro organismo existen alrededor de 200 tipos celulares y aunque cualquiera de ellos potencialmente podría originar un tumor, la frecuencia de aparición no es equivalente para todos. Los tumores de origen epitelial representan un 80% del total debido a la alta capacidad de renovación de los epitelios y a la mayor exposición de sus células a carcinógenos ambientales. Por este motivo, dentro de los cánceres epiteliales, el cáncer de piel es una de las enfermedades más prevalentes a nivel mundial.

2. La piel

La piel es el órgano que recubre el organismo y que está especializado en proporcionarle una cobertura flexible y resistente, actuando como barrera protectora entre organismo y ambiente. Histológicamente la piel está constituida por dos tipos de tejidos: la dermis y la epidermis.

La dermis es la capa más interna de la piel formada por un tejido conectivo laxo que sirve de soporte a la epidermis. Está compuesta principalmente de una matriz de fibras de colágeno y fibras elásticas, pocas células, principalmente fibroblastos, numerosos vasos sanguíneos, canales linfáticos y terminaciones nerviosas. En la dermis se encuentran la base de los folículos pilosos y las glándulas sudoríparas derivadas de la epidermis.

La epidermis es un epitelio estratificado y queratinizado que realiza en el organismo una función esencialmente protectora ante todo tipo de agresiones externas. Este tejido se encuentra constituido por diferentes poblaciones celulares (queratinocitos, melanocitos, células de Langerhans y células de Merkel). El tipo celular predominante (más del 90%) es el queratinocito, que se dispone en cuatro estratos o capas: basal, espinoso, granuloso y córneo (fig. 1). El único estrato con capacidad proliferativa es el basal, constituido por una capa de queratinocitos que reposan sobre la lámina basal y la dermis subyacente (Lavker y Sun, 1983; Potten y Morris, 1988). Estas células se caracterizan por la expresión de marcadores como son las citoqueratinas K5 y K14. A medida que los queratinocitos se dividen, abandonan este estrato dando lugar en su proceso de diferenciación al resto de los estratos superiores. Durante este proceso de diferenciación pierden su capacidad proliferativa. El estrato espinoso recibe este nombre debido a la apariencia que muestran los desmosomas a microscopía óptica. Las células de este estrato, aunque no han perdido totalmente la capacidad mitótica (Bailleul y col., 1990), normalmente no se dividen y tienen una gran actividad metabólica. Entre otros marcadores, estas células se caracterizan por la expresión de las citoqueratinas K1 y K10, que se emplean como marcadores de diferenciación temprana. En el estrato granuloso las células presentan numerosos gránulos de queratohialina que le confieren un aspecto característico. También existen gránulos lamelares (cuerpos de Odly) cuya exocitosis libera material lipídico alrededor de la célula, lo que contribuye a la función de la epidermis como barrera aislante (Grubauer y col., 1989). Proteínas como la loricrina o la filagrina se expresan en este estrato siendo indicadoras de diferenciación tardía. Por último, en el estrato córneo, las células se vuelven aplanadas, pierden el núcleo y forman una multicapa de células diferenciadas

terminalmente y suspendidas en una matriz lipídica (Plewig y col., 1997; Potts y Francoeur, 1991) que tienden a desprenderse y descamarse por fricción, siendo reemplazadas por otras células provenientes de capas inferiores. Este estrato es el responsable final de la función protectora de la epidermis.

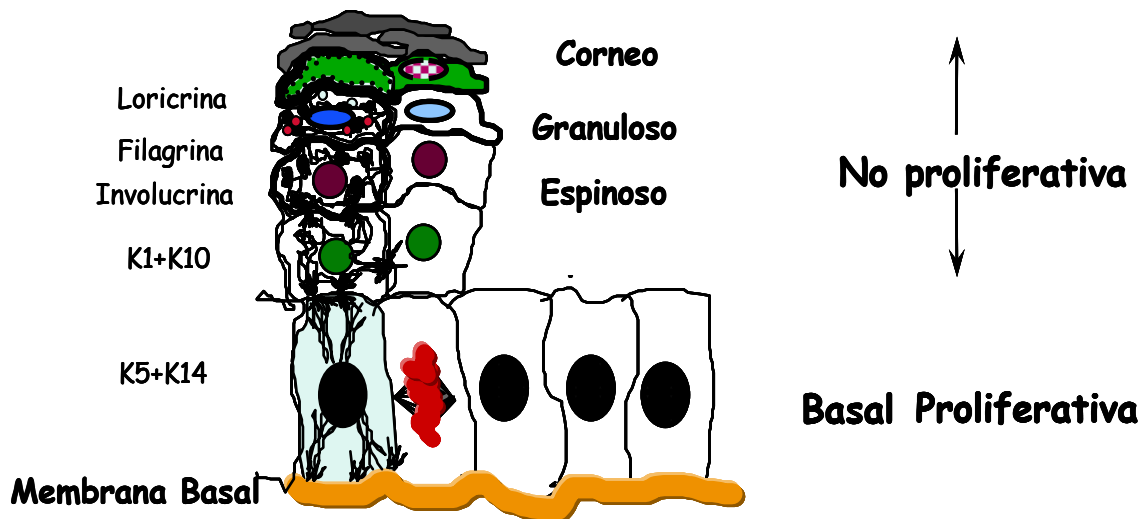


Figura 1. La epidermis. Esquema general de la epidermis en el que se representan los estratos que la constituyen y las proteínas marcadoras específicas que se expresan en cada uno de ellos.

La formación de todos estos estratos es el resultado de un complejo proceso programado de diferenciación. El queratinocito de la capa basal, no diferenciado y con capacidad mitótica, recibe determinadas señales que provocan la disminución de la expresión de ciertos receptores e integrinas, migra hacia capas superiores a la vez que pierde completamente su capacidad proliferativa y diferencia de forma gradual para transformarse en queratinocito córneo, célula muerta, anucleada, con forma de escama y altamente diferenciada (Eckert y Rorke, 1989; Fuchs, 1990). Finalmente, la célula córnea se desprende, por procesos mecánicos como la fricción, de manera continua. Este proceso precisa de un continuo recambio celular a partir de capas inferiores. Como consecuencia, se necesita un equilibrio cuidadosamente regulado entre los diferentes procesos de proliferación y diferenciación que afectan al queratinocito basal.

2. 1. La epidermis de ratón como sistema modelo

La epidermis de ratón es un sistema modelo excelente para estudiar procesos de proliferación y diferenciación debido a que ambos procesos se encuentran perfectamente compartimentados y caracterizados por medio de marcadores específicos. Además, la epidermis es un tejido fácilmente accesible y manipulable del que se pueden hacer biopsias y llevar un seguimiento visual en todo momento. El aislamiento y la caracterización de las secuencias reguladoras de la expresión de queratinas *in vivo* (Ramirez y col., 1994; Ramirez y col., 1995; Sinha y Fuchs, 2001), han permitido su uso para dirigir la expresión de genes de interés de un modo específico en las distintas capas de la epidermis de ratones transgénicos. Otra ventaja de la epidermis es la posibilidad de aislar queratinocitos para establecer cultivos primarios, así como su utilización para realizar trasplantes de piel en receptores inmunodeficientes. Por último, los procesos de tumorigénesis en epidermis se pueden analizar de forma exhaustiva gracias a protocolos de carcinogénesis química inducida, lo que permiten un estudio secuencial de las alteraciones genéticas y fenotípicas de las neoplasias en piel (DiGiovanni, 1992).

3. Tumorigénesis en la piel

Como se ha mencionado anteriormente, cualquier tipo celular puede potencialmente generar un tumor, pero aproximadamente un 80% de los tumores son generados a partir de células epiteliales, y se denominan carcinomas. Este alto porcentaje se debe a que las células de los epitelios conservan su capacidad de dividirse a lo largo de la vida del individuo, y a que, por su lugar de localización, son más susceptibles a la agresión de agentes externos.

El cáncer epidérmico no-melanoma representa más del 50% de los tumores que se diagnostican anualmente. A nivel clínico pueden clasificarse en dos tipos: carcinomas de células basales (BCCs) y carcinomas de células escamosas (SCCs) (fig. 2). Ambos se originan a partir de queratinocitos de la capa basal de la epidermis. Los BCCs presentan un crecimiento lento limitándose a invadir y deteriorar los tejidos

circundantes. Los SCCs, menos frecuentes, presentan una alta capacidad de infiltración y pueden dar lugar a metástasis (Alam y Ratner, 2001).

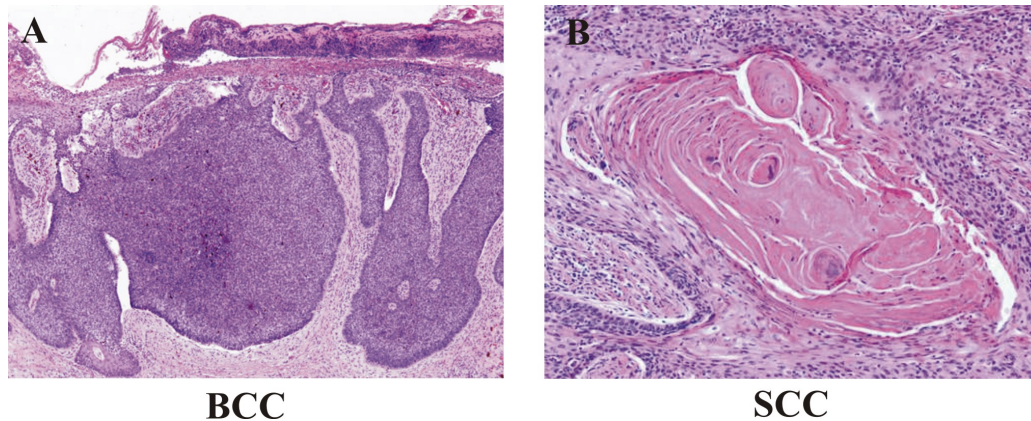


Figura 2. Cáncer de piel no melanoma. Aspecto histológico de los dos tipos de cáncer epidérmico no melanoma. A) Carcinoma de células basales (BCC). B) Carcinoma de células escamosas (SCC).

La formación de un cáncer epidérmico pasa por diversas etapas (fig. 3). A partir de un tejido epidérmico normal, se produce la hiperproliferación de algunas de sus células dando lugar a una hiperplasia. Posteriormente se produce una displasia, en la que las células comienzan a presentar una morfología alterada y la estructura del tejido se pierde. Las displasias dan lugar a carcinomas *in situ* donde hay un aumento de desorganización y las células alteradas comienzan a atravesar la membrana basal. Cuando las células transformadas atraviesan totalmente la membrana basal e invaden el tejido subyacente se llega al estado de carcinoma invasivo. Las células de estos carcinomas pueden migrar hacia otras zonas del organismo dando lugar a metástasis y formando tumores secundarios una vez establecidas. Los carcinomas se pueden clasificar según su grado de diferenciación en carcinomas bien diferenciados (Grado I. Menos de un 25% de células indiferenciadas), moderadamente diferenciados (Grado II. Menos de un 50% de células indiferenciadas), pobremente diferenciados (Grado III. Menos de un 75% de células indiferenciadas) o anaplásticos o pleomórficos (Grado IV. Más de un 75% de células indiferenciadas) (Clasificación de Broders, 1946). El carcinoma denominado “carcinoma de células fusiformes” es una de sus formas más agresivas. Estos carcinomas están constituidos por células que han perdido sus

características epiteliales y han doptado morfología fusiforme. De esta forma adquieren propiedades mesenquimales pudiendo dar lugar a metástasis durante el proceso de transición epitelio-mesénquima (TEM) que desarrollaremos más adelante.

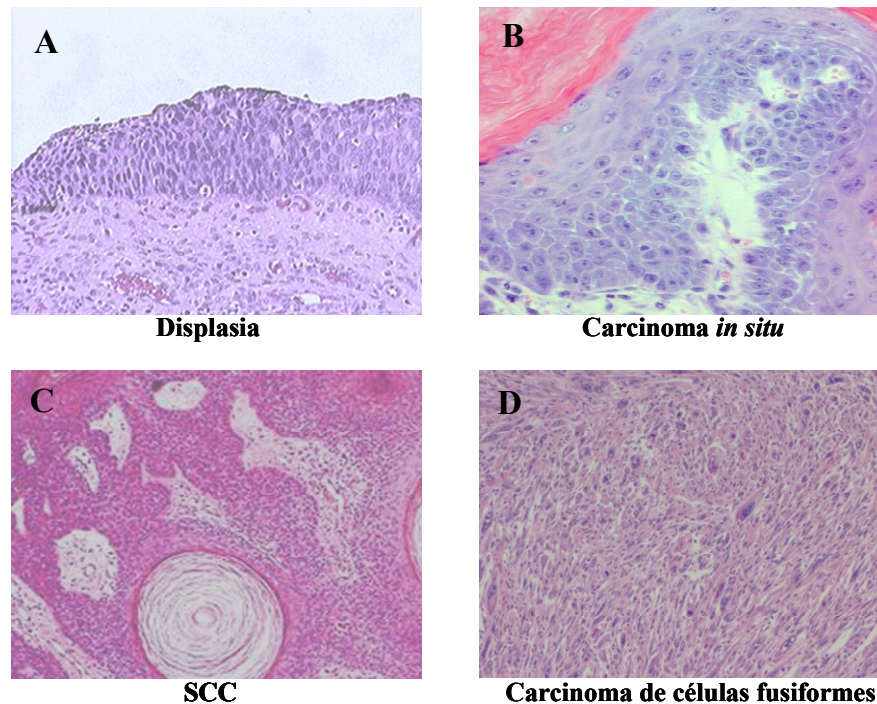


Figura 3. Ejemplo de las etapas más representativas que se producen en el proceso de tumorigénesis en la epidermis. A) Hiperplasia de la epidermis debido a la proliferación descontrolada de los queratinocitos de la capa basal y pérdida de la estructura de las capas que conduce a una displasia. **B)** La displasia y desorganización de la epidermis da lugar a un carcinoma in situ en el que los queratinocitos atraviesan la membrana basal invadiendo la dermis. **C)** SCC con la presencia de las características perlas de queratina. **D)** Carcinoma de células fusiformes, grado más agresivo de SCC, con capacidad invasiva.

3. 1. Células madre epidérmicas

En la piel humana existen dos poblaciones de células madre epidérmicas: las que están presentes en la capa basal de la epidermis interfolicular y las que se localizan en una región del folículo piloso denominada *bulge* (Fuchs, 2007) (fig. 4). Se trata de células progenitoras multipotentes que debido a su alta capacidad mitótica permiten la renovación continua del epitelio y la homeostasis del tejido en condiciones normales. Las células madre del folículo piloso, además de ser las responsables de la

regeneración y crecimiento del folículo, pueden regenerar la epidermis interfolicular en casos en que la integridad de la piel se vea comprometida ante heridas, quemaduras, etc (Fuchs y Nowak, 2008). Ambas poblaciones se encargan de contribuir en los procesos de re-epitelización. Es posible que defectos en el crecimiento de las células madre epidérmicas o de las células amplificadoras transitorias constituyan un factor patológico clave en alteraciones epidérmicas como son los carcinomas de células escamosas entre otras (Benitah, 2007; Kamstrup y col., 2008; Lorz y col., 2009; Zouboulis y col., 2008). En la epidermis de ratón las células madre epidérmicas se localizan mayoritariamente en la región del *bulge*. Aún no está clara la posible localización en piel de ratón de células madre en zonas interfoliculares, aunque algunos estudios han permitido marcarlas en estas zonas mediante técnicas de LRC (del inglés *label retaining cell*, células que retienen el marcaje) (Kaur, 2006).

La alta capacidad de renovación de las células madre epidérmicas foliculares y la posibilidad de que su multipotencialidad dé lugar a su diferenciación a diversas estructuras, las hace muy atractivas para su estudio en medicina regenerativa, reparación de tejidos, terapia génica y terapia celular.

Existen genes que están asociados con las células madre epidérmicas, y que en ocasiones también se expresan en las células amplificadoras transitorias, que pueden considerarse como marcadores que contribuyen a mantener el carácter de célula madre y la capacidad proliferativa. Entre ellos podemos destacar a p63, CD34, K15 y K19 y a las integrinas $\alpha 6$ y $\beta 1$ (Cotsarelis, 2006; Ma y col., 2004). p63 es un homólogo de p53 que se expresa en la capa basal de la epidermis. Los animales deficientes en p63 poseen una epidermis muy fina e importantes defectos en la proliferación, estratificación y diferenciación de la epidermis debido a que el principal papel de p63 es mantener la potencialidad proliferativa de las células amplificadoras transitorias epidérmicas. Por otra parte, la elevada expresión de *c-Myc* en las células madre y células amplificadoras transitorias de la epidermis conduce a un estado hiperproliferativo, defectos en la diferenciación y en el crecimiento del pelo y aparición de heridas. La consecuencia de esta sobreexpresión de *c-Myc* podría ser una disminución de la población de células

madre debido a una actividad exagerada de éstas, lo que da lugar a todas las alteraciones mencionadas anteriormente (Fuchs y Raghavan, 2002).

Determinados estudios sostienen que los niveles relativos de BMP y Wnt son esenciales para procesos de quiescencia y activación de las células madres foliculares. La ausencia de *Bmpr1* en epidermis induce la proliferación de las células madre del nicho epidérmico causando su expansión como consecuencia de señales activadoras vía Wnt y PI3K/Akt (Kobielak y col., 2007; Lorz y col., 2009; Segrelles y col., 2008).

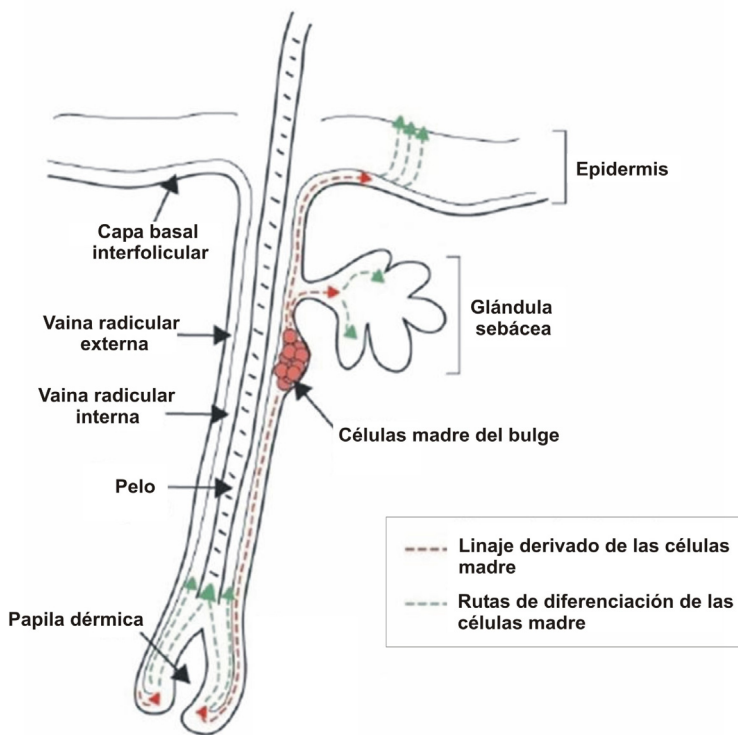


Figura 4. Folículo piloso. Esquema de las partes de un folículo piloso entre las que destacan las distintas capas que lo componen y diagrama de los distintos linajes celulares derivados de las células madre del bulge. La línea roja discontinua corresponde a los distintos linajes con posibilidad de formar el pelo, la glándula sebácea y la epidermis. La línea verde representa los posibles patrones de diferenciación de las células derivadas del bulge en función de la región en la que se encuentren (modificada de Alonso y Fuchs, 2003).

3. 2. Células madre del cáncer

Hasta ahora se ha defendido que la mayoría de tumores malignos tiene un origen clonal, es decir, se originan a partir de una célula individual que acumula mutaciones genéticas. Pero actualmente cada vez es más evidente que el tumor depende de un grupo de células minoritarias, sus células madre, para desarrollarse y seguir creciendo (fig. 5). Aunque se estipula que la población inicial de células madre en el tumor es aproximadamente de un 0.1%, recientes estudios que utilizan métodos de selección más permisivos, demuestran que hasta un 25% de las células aisladas a

partir de melanomas humanos son capaces de desarrollar un tumor (Quintana y col., 2008).

En definitiva, y partiendo de la observación de que aparentemente no toda célula tumoral es 'iniciadora del tumor', se han desarrollado dos teorías. Una sostiene que cualquier célula tumoral puede dar lugar a un nuevo cáncer; sin embargo, la entrada en división de esa célula (requisito para que se origine el tumor) es algo poco probable. Según la segunda teoría, las células tumorales se podrían organizar en una jerarquía tal que sólo un pequeño número de ellas poseería la capacidad de iniciar un tumor. Si el primer modelo fuese correcto, todas las células en un tumor serían homogéneas desde un punto de vista biológico y los programas responsables de la malignización deberían estar activos en la mayoría de las células que forman el tumor. El modelo jerárquico, sin embargo, predice que las células tumorales son heterogéneas desde un punto de vista funcional y que las unidades capaces de iniciar un cáncer constituyen una población minoritaria dentro de la masa de células tumorales. Esta última hipótesis se ha demostrado en tumores sólidos mediante el estudio de modelos animales de tumorigénesis epitelial entre otros (Visvader y Lindeman, 2008). Estas células iniciadoras tienen propiedades características de las células madre convencionales, son capaces de autorrenovarse y tienen potencial para generar cualquier tipo celular dentro del tumor y dividirse incontroladamente liderando su expansión. Por ello se las denomina células madre del cáncer (o, según la terminología anglosajona, '*cancer stem cells*' (Huntly y Gilliland, 2005; Lobo y col., 2007).

Además de aislar y caracterizar las células madre tumorales, es importante identificar los genes y proteínas que facilitan la capacidad de autorrenovación propia de todas las células madre. Como parte del proceso de transformación tumoral, las células iniciadoras del tumor parecen 'recuperar' las proteínas responsables de la autorrenovación en las células madre embrionarias y del adulto. El estudio de estos genes y proteínas implicados en mantener las características de las células madre tumorales revelará nuevas dianas contra las que podrían ir dirigidos nuevos agentes terapéuticos (Chumsri y Burger, 2008; Jones, 2006).

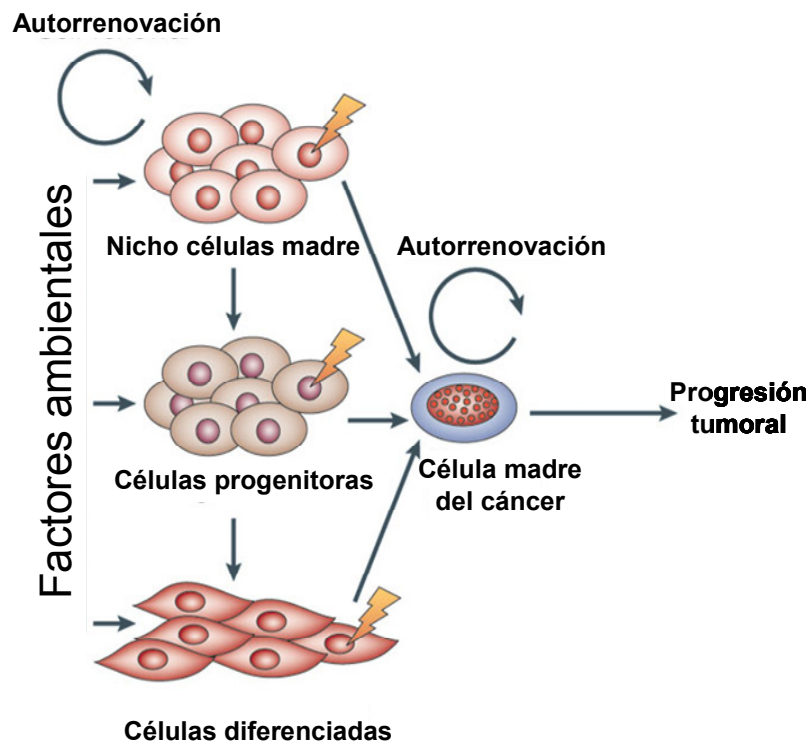


Figura 5. Células madre del cáncer. Factores, origen y capacidad de autorrenovación de las células madre del cáncer que conducen a la progresión tumoral (modificada de Bjerkvig y col., 2005).

3. 3. Modelo de carcinogénesis química en epidermis

Como hemos comentado anteriormente una de las ventajas que presenta la epidermis de ratón como modelo de estudio, es la posibilidad de realizar un protocolo de carcinogénesis química *in vivo* con el propósito de establecer la implicación que tienen determinados proto-oncogenes, genes supresores de tumores y procesos como la angiogénesis en el desarrollo tumoral.

El protocolo de carcinogénesis química se divide en tres etapas (DiGiovanni, 1992; Slaga y col., 1996):

- **Iniciación:** Se produce tras la aplicación tópica de un carcinógeno (normalmente DMBA). Ocasiona mutaciones irreversibles en el oncogén H-Ras que, en principio, no tienen consecuencias fenotípicas.

- Promoción: Se induce tras la aplicación de un estímulo hiperproliferativo como es el caso del éster de forbol, TPA. Se desarrollan lesiones premalignas denominadas papilomas escamosos.
- Conversión: Algunos de estos papilomas evolucionan a carcinomas escamosos (SCCs), tumores malignos que pueden clasificarse según su grado de diferenciación y malignidad. Algunos de estos carcinomas progresan a carcinomas fusiformes muy indiferenciados y agresivos.

La progresión tumoral conseguida por este sistema se correlaciona con alteraciones moleculares concretas bien caracterizadas. Durante la progresión tumoral las células presentan inestabilidad genómica que conduce a la aparición de aneuploidías y otras alteraciones cromosómicas. La transición a SCC se caracteriza principalmente por la pérdida funcional del supresor tumoral p53. Los ratones deficientes en p53 sometidos a carcinogénesis química tienen una tasa mayor de conversión maligna ya que las alteraciones moleculares hacen que las células de los papilomas tengan una ventaja proliferativa que permiten la conversión a SCC (Kemp y col., 1993). La conversión a carcinoma fusiforme se produce por la pérdida del alelo *Ink4^{arf}* que codifica para los inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (CKIs) p16, p15 y p19, así como por la inducción de la expresión de genes implicados en TEM como son *Snail* y *Slug* (Bolos y col., 2003; Cano y col., 2000).

3. 4. Inflamación y carcinogénesis epitelial

La inflamación representa un proceso esencial en la inmunidad innata y en la adquisición de la inmunidad específica, importantes para detener el crecimiento de los tumores. Sin embargo, cuando la inflamación se torna crónica, surgen numerosos factores que pueden estimular la evolución del cáncer. Los posibles mecanismos por los que la inflamación puede contribuir a la carcinogénesis incluyen inducción de la inestabilidad genómica, alteraciones en procesos epigenéticos, aumento en la proliferación de células iniciadas, resistencia a apoptosis, neovascularización y metástasis. La sobreexpresión, elevada secreción o anormal activación de mediadores proinflamatorios, como quimioquinas y citoquinas (IFN-1, TNF, IL-1 e IL-6, entre otras),

induce señales intracelulares que pueden facilitar la promoción y la progresión tumoral. Por otra parte, los componentes del microambiente tumoral como son las células estromales en el tejido circulante y las células inflamatorias infiltrantes, generan una expresión aberrante o activación de algunas moléculas proinflamatorias, lo que propicia fenómenos angiogénicos e invasivos que conducen a la malignización del tumor. La inflamación, por tanto, promueve el desarrollo de cáncer. Recientemente, los microARNs están siendo estudiados como unas potenciales moléculas responsables de la relación entre inflamación y cáncer (Kundu y Surh, 2008).

La implicación de la señalización mediada por la familia NFκB en la inflamación es bien conocida (Karin y col., 2002). NFκB es un factor de transcripción que forma parte de la vía de señalización IKK-IκB-NFκB implicada en procesos de proliferación celular, supervivencia, angiogénesis, metástasis e inflamación (Aggarwal, 2004). Esta vía se ha demostrado como uno de los mecanismos más relevantes en diferentes procesos fisiológicos y patológicos en epidermis. La inducción de NFκB ante alteraciones fisiológicas de la piel conduce a un reclutamiento de células inmunológicas para contrarrestar el efecto. En condiciones normales el sistema vuelve a la normalidad, pero en el caso de procesos carcinogénicos o inflamación crónica, se producen mutaciones y/o cambios permanentes que conducen a la activación constitutiva de la vía de NFκB (Fuchs, 2007; Zhang y col., 2004). Recientemente se ha descrito que p53 es un inhibidor de la inflamación que actúa como antagonista de NFκB, inhibiendo la transcripción de promotores dependientes de este factor nuclear (Komarova y col., 2005). p53 inhibe así la transcripción de genes dependientes de TNFα, que está altamente regulado por NFκB. Esta implicación de p53 en la respuesta inmunitaria innata está en consonancia con su función supresora tumoral.

3. 5. Transición epitelio-mesénquima y metástasis

La conversión de un carcinoma *in situ* en un tumor con características metastásicas supone la puesta en marcha de un conjunto de fenómenos celulares, mediante los cuales, la célula pierde algunas de sus características epiteliales

cambiando su morfología, motilidad, adhesión y expresión génica, adquiriendo propiedades mesenquimales. Este proceso, denominado transición epitelio-mesénquima (TEM), permite que la célula epitelial transformada adquiera propiedades migratorias e invasivas que conducirán a metástasis. Los componentes celulares que forman parte de la maquinaria de adhesión celular son los principales protagonistas de la TEM ya que modulan los cambios de forma y movilidad de la célula (Thiery, 2002).

La TEM fue descrita por primera vez a partir de estudios *in vitro* en células epiteliales de córnea, en los que se observó la implicación de este fenómeno en procesos del desarrollo embrionario y en carcinogénesis (Hay, 1982). Durante el desarrollo embrionario, el proceso de TEM tiene lugar en la formación de determinados tejidos como son el mesodermo, la cresta neural y las válvulas del corazón entre otros. El proceso reverso a la TEM, o TME, también tiene lugar en determinados procesos durante el desarrollo y demuestra el gran nivel de plasticidad de las células a la hora de revertir el fenotipo de célula mesenquimal a epitelial y viceversa, tanto en condiciones normales como en patológicas. Las señales responsables de inducir TEM durante la embriogénesis, son las que pueden llegar a estar implicadas en los procesos de invasión tumoral y metástasis. Recientemente se ha descrito que la hipoxia puede ser, en parte, la causante de la activación de distintas vías de señalización responsables en última instancia del proceso de TEM (Yang y Weinberg, 2008).

Determinadas vías de señalización como son Wnt, Hedgehog, Noth, NFκB y TGF-β están implicadas en el proceso de TEM y asumen un importante papel en la progresión tumoral y en la metástasis (Moustakas y Heldin, 2007). Un evento crítico en la TEM es la desregulación de E-cadherina. Moléculas como Snail, Slug, ZEB1, ZEB2, Twist1 y Twist2 son reguladores transcripcionales clave de la TEM ya que reprimen la expresión de CDH1, gen que codifica para E-Cadherina (Katoh y Katoh, 2008) (fig. 6). Snail es el factor que juega un papel predominante en la inducción de la TEM en tumores primarios, mientras que el resto de los factores están implicados en mantener el fenotipo migratorio de las células tumorales. Además de favorecer la TEM, los factores Snail inducen proliferación y supervivencia celular necesarias para la

progresión tumoral. Recientes estudios indican que los factores Snail inhiben la respuesta apoptótica mediada por p53 reprimiendo la transcripción de genes proapoptóticos. Es el caso de PUMA, antagonista de la proteína antiapoptótica BCL2, cuya transcripción se ve reprimida por acción de Slug. La desregulación se produce en genes proapoptóticos dependientes o no de p53, mientras que la expresión de *Tp53* no se ve casi alterada (Peinado y col., 2007). También ha sido ampliamente estudiada la conexión entre Twist y ZEB en procesos de senescencia y ciclo celular, comportándose como antagonistas de apoptosis y senescencia revertiendo el bloqueo del ciclo celular inducido por p53, o inhibiendo p21 por vías independientes de p53 (Ansieau y col., 2008; Smit y Peeper, 2008).

La formación de metástasis es un proceso dinámico y complejo que comprende una serie de etapas (fig. 7):

- Transformación inicial y crecimiento progresivo de las células neoplásicas.
- Vascularización masiva. Síntesis y secreción de factores proangiogénicos que establecerán el plexo neovascular a partir de los tejidos que rodean al tumor.
- Intravasación o invasión local del estroma vía sanguínea o linfática por algunas de las células tumorales iniciales.
- Separación y embolización de pequeños agregados de células tumorales. Las células que han sobrevivido a la circulación, al adherirse a las células endoteliales de los capilares o a la membrana basal subendotelial, quedan atrapadas en los lechos capilares de los órganos.
- Extravasación y migración de las células.

El proceso de formación de metástasis se completa con la posterior proliferación en el parénquima del órgano colonizado. Las micrometástasis tienen que desarrollar una red vascular, invadir y penetrar en los vasos sanguíneos y entrar en la circulación para seguir produciendo metástasis.

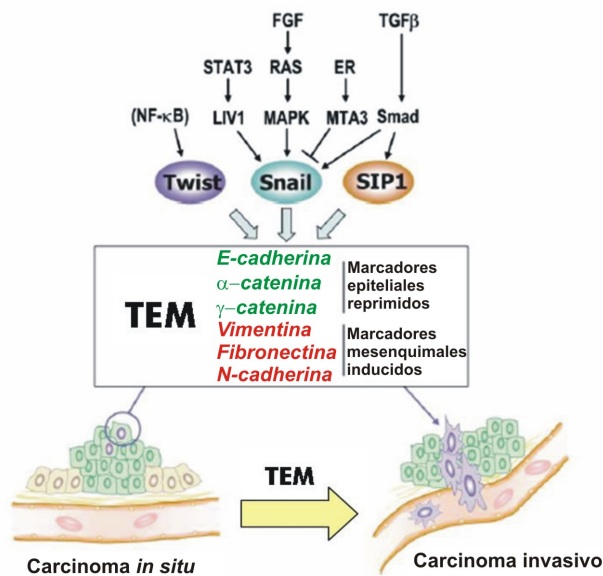


Figura 6. Moléculas implicadas y vías de señalización que intervienen en el proceso de TEM. Ejemplos de marcadores epiteliales reprimidos y mesenquimales inducidos en el proceso de TEM (modificada de Kang y Massague, 2004).

Los modelos animales para el estudio de los procesos de metástasis son escasos. En la mayoría de los casos, los modelos usados para identificar los mecanismos por los que las células cancerosas metastatizan, se limitan a realizar en los animales una inyección intracardiaca o intravenosa por la que las células cancerosas pasan de forma directa al torrente circulatorio. Es el caso de algunos modelos animales de cáncer de mama (Kuperwasser y col., 2005). Otros modelos para cáncer de pulmón contienen mutaciones en *K-ras* y *Trp53* y desarrollan adenocarcinomas agresivos y que metastatizan siguiendo un patrón similar a los cánceres de pulmón humanos (Zheng y col., 2007). Modelos inducibles con sobreexpresión de *K-ras* y mutaciones en *Trp53* específicamente en epidermis desarrollan tumores de piel agresivos que metastatizan formando focos epiteliales en pulmón (Caulin y col., 2007). Recientes estudios han permitido determinar algunas de las bases moleculares de la metástasis gracias a la utilización *in vivo* de células metastásicas humanas modificadas. De esta forma, entre otros estudios, se ha demostrado que las señales provenientes del microambiente del

tumor primario intervienen en la progresión del proceso metastásico. Por ejemplo, la citoquina TGF- β promueve la metástasis permitiendo la extravasación de las células cancerígenas desde los vasos sanguíneos y su entrada en pulmón (Padua y col., 2008). Los microARNs también están siendo exhaustivamente estudiados ya que, posiblemente, sean moléculas clave en la regulación de los procesos de metástasis. Concretamente se ha demostrado la implicación de ciertos microARNs, como son el miR-126 y el miR-335, en la supresión de la metástasis en cáncer de mama (Tavazoie y col., 2008). De esta forma se amplían las posibilidades de encontrar tratamientos adecuados que frenen la metástasis en cáncer humano.

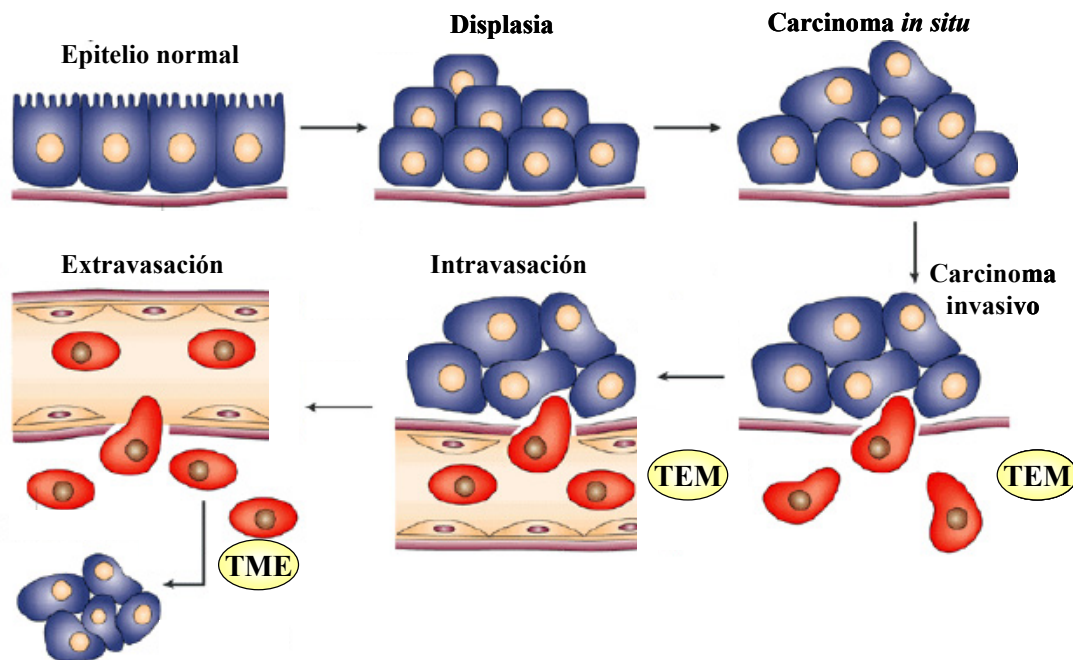


Figura 7. Fases del mecanismo de metástasis. A partir de un epitelio normal se producen sucesivas alteraciones que conducen a que las células del tumor primario adquieran propiedades invasivas y migren vía sanguínea dando lugar a focos tumorales en otras localizaciones (modificada de Thiery, 2002).

3. 6. La angiogénesis en el desarrollo tumoral

Para que una masa tumoral alcance cierto tamaño ha de tener lugar la formación de nuevos vasos sanguíneos, es decir, el proceso de angiogénesis. Los tumores malignos de rápido crecimiento requieren de un aporte sanguíneo mayor que el que puede necesitar un tejido sano. El fenómeno de la angiogénesis es relativamente común en el organismo y tiene lugar en condiciones normales en el desarrollo de la placenta, crecimiento fetal, ciclo menstrual y cicatrización de heridas, entre otras circunstancias. La formación de nueva vascularización comprende varias etapas relacionadas entre sí:

- Degradación local de la membrana basal y de la matriz extracelular de las células endoteliales de los vasos. En este proceso interviene la angiopoyetina 2.
- Proliferación y migración de células endoteliales hacia el lugar del estímulo angiogénico. Los factores proangiogénicos VEGF/VPF inducen la proliferación de las células endoteliales e incrementan la permeabilidad vascular. Otros factores proangiogénicos como la IL-8, factor de crecimiento derivado de plaquetas, estimula la síntesis de ADN en las células endoteliales y aumenta su capacidad de migración.
- Por acción de la angiopoyetina 1, entre otras moléculas, las células endoteliales se asocian formando estructuras tubulares que se estabilizan gracias a la formación de una nueva matriz extracelular. Se van formando así nuevos vasos que irán madurando progresivamente.

La formación de nuevos vasos obedece a diversas señales mitogénicas que se transmitirán a través de la membrana de las células endoteliales. Entre ellas destaca el VEGF que, uniéndose a receptores específicos presentes en la membrana, dispara los mecanismos angiogénicos induciendo la proliferación del endotelio y la permeabilidad vascular (Harmey y col., 2002). Las células endoteliales conservan su unión célula a célula gracias a moléculas de adhesión como pueden ser CD31 (también denominado PECAM-1). Además de sus propiedades adherentes, esta molécula juega un papel de gran importancia en la señalización de procesos vasculares como son la angiogénesis,

la acción plaquetaria y la migración de leucocitos (Woodfin y col., 2007). Se puede considerar por tanto como un buen marcador de formación de nuevos vasos.

Durante el desarrollo tumoral el disparo de los procesos angiogénicos se produce como consecuencia de un desequilibrio entre los efectos de moléculas activadoras e inhibidoras de la angiogénesis (fig. 8). Entre las moléculas activadoras destacan VEGF, interleuquina-8, TGF- β , TNF- α y PDGF. Como moléculas inhibidoras destacan la angiostatina, endostatina, TSP-1 e interleuquina-12 (Carmeliet y Jain, 2000).

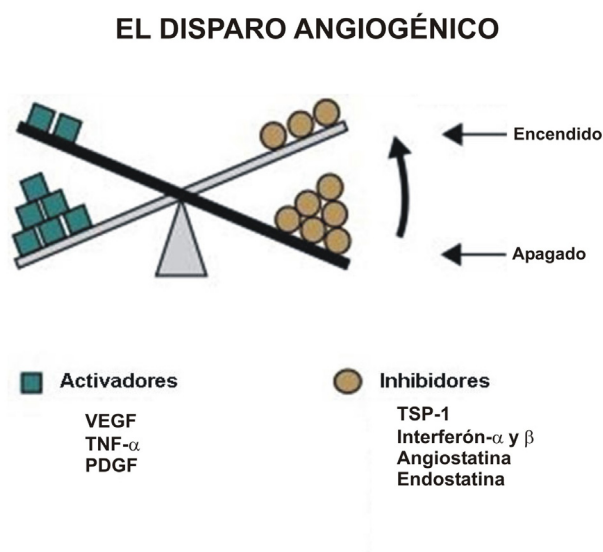


Figura 8. Disparo angiogénico y principales moléculas activadoras e inhibidoras de la angiogénesis. Los mecanismos angiogénicos se producen a partir de un desequilibrio entre moléculas activadoras e inhibidoras de la angiogénesis (modificada de Hanahan y Folkman, 1996).

Durante el proceso de carcinogénesis química en piel de ratón, el disparo de la angiogénesis se produce en las primeras etapas de la progresión tumoral. Se trata de un evento temprano que puede preceder incluso a la formación de los papilomas. La inducción del ARNm del oncogén *H-ras* antes de la formación de los primeros papilomas provoca la expresión de VEGF (Larcher y col., 1998; Larcher y col., 1996). Los animales transgénicos que expresan VEGF en capas basales de la epidermis presentan un mayor desarrollo tumoral (Larcher y col., 1998). VEGF es por tanto un factor de gran importancia en los procesos de tumorigénesis en piel (fig. 9). La

inducción de VEGF en las células tumorales se debe a que la activación de H-ras produce la inducción de EGFR que conduce a la represión de moléculas inhibitoras de la angiogénesis como son ang-1 y a la inducción de activadoras como VEGF. Además, los animales transgénicos que expresan un alelo mutante dominante negativo de EGFR en la capa basal de la epidermis presentan inhibición del desarrollo tumoral tras protocolos de carcinogénesis química (Casanova y col., 2002). Finalmente, se ha descrito que queratinocitos murinos deficientes en VEGF no son tumorigénicos, e incluso su malignidad se reduce tras una inducción de tumorigénesis vía H-ras (Mirones y col., 2009).

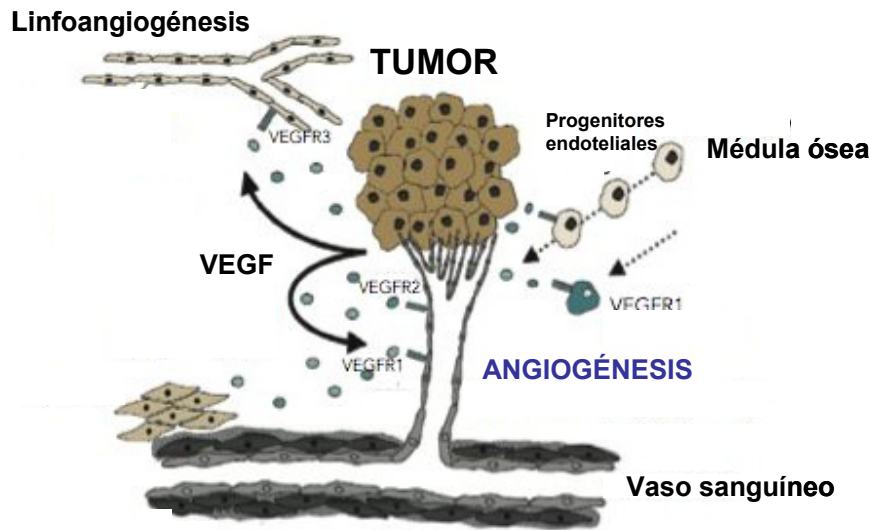


Figura 9. VEGF y angiogénesis. Inducción de VEGF y su implicación en los procesos de linfoangiogénesis y angiogénesis (modificada de Hicklin y Ellis, 2005).

La activación de determinadas vías de señalización implicadas en tumorigénesis puede provocar el desequilibrio entre moléculas activadoras e inhibitoras de angiogénesis, induciéndose así la formación de nuevos vasos. Es el caso de la vía de PI3K, ampliamente estudiada en procesos de tumorigénesis epitelial debido a su papel en la progresión tumoral. Se ha descrito que VEGF activa la vía de PI3K regulando la supervivencia celular en células endoteliales (Gerber y col., 1998). Por el contrario PTEN, efector negativo de la ruta PI3K, inhibe la activación transcripcional de VEGF

reprimiendo así los procesos angiogénicos (Wen y col., 2001). La sobreexpresión de Akt, efector de la vía de PI3K, conduce al aumento de los niveles del AmRN de VEGF y a la inducción de la angiogénesis (Jiang y col., 2000). Esto es lo que ocurre tras la sobreexpresión de Akt en queratinocitos. Esta sobreexpresión contribuye a la tumorigénesis por un incremento de la malignidad de los queratinocitos debido a un aumento post-transcripcional de los niveles de VEGF, mediándose así una respuesta angiogénica (Segrelles y col., 2002; Segrelles y col., 2004). Esto demuestra que Akt es un importante mediador de la angiogénesis en procesos de carcinogénesis epitelial.

3. 7. MicroARNs y cáncer

Los microARNs son pequeños ARNs de aproximadamente 22 nucleótidos no codificantes de proteína que funcionan como reguladores negativos de la expresión génica. Actúan como represores de la expresión de sus genes diana inhibiendo su traducción o promoviendo su degradación. Recientes estudios evidencian que los microARNs están implicados en multitud de procesos fisiológicos y que alteraciones en su expresión pueden ser causa de diversas patologías entre las que se encuentra el cáncer. Su implicación en procesos carcinogénicos indica que los microARNs pueden funcionar como oncogenes o genes supresores de tumores según la acción del gen que estén regulando lo que explicaría por qué un mismo microRNA puede funcionar como oncogén o como supresor tumoral en diferentes tejidos. Su mecanismo de acción se asemeja al de los ARNs de interferencia. Los microARNs se asocian a los complejos proteicos de silenciamiento (miRISC) reprimiendo así la traducción de su ARN mensajero diana (Eulalio y col., 2008).

Los microARNs son sintetizados por la ARN polimerasa II en forma de un largo precursor denominado *pri-miARN*. Este precursor es procesado en el núcleo por diversas proteínas como son la ARNasa III Drosha y el cofactor DGCR8. Se forman así unos *pre-microARNs* de unos 70 nucleótidos que son exportados al citoplasma donde otros moduladores, como son la ARNasa III Dicer, los escinden dando lugar a

estructuras en doble cadena de unos 22 nucleótidos que posteriormente originarán los microARNs maduros de cadena sencilla. El microARN maduro se une a sitios complementarios en 3' de su ARN mensajero diana para regular negativamente la expresión del gen, bloqueando su traducción o favoreciendo la degradación del ARN mensajero (Valencia-Sanchez y col., 2006) (fig. 10).

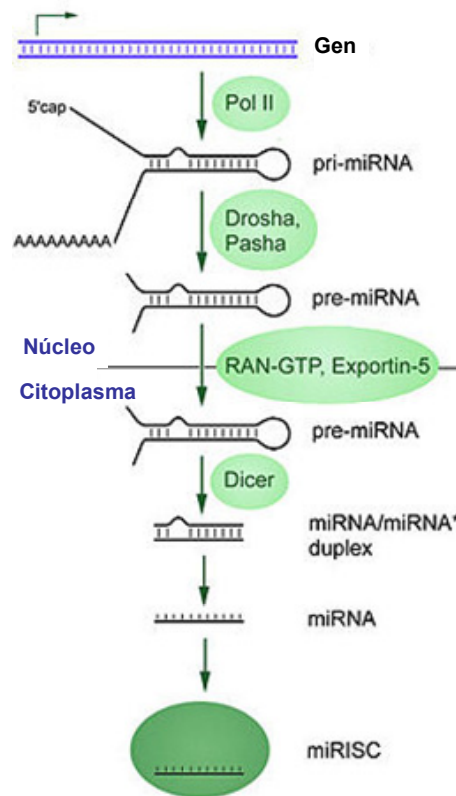


Figura 10. Esquema general del procesamiento de microARNs en animales. Consecución de etapas desde la transcripción a la formación del complejo efector.

Se han identificado aproximadamente unos 400 microARNs en el genoma humano, pero se estima que existen más de 1000, lo que comprendería de un 1 a un 4% de todos los genes expresados. Esto hace que los microARNs sean el tipo mayoritario de reguladores génicos (regulan aproximadamente un 30% de los transcritos humanos). La mayoría de las secuencias de los microARNs se localizan agrupadas dentro de determinados cromosomas. Por ejemplo, existe una agrupación en el cromosoma 19 formada por 54 microARNs. Además, los microARNs se agrupan en familias según la homología de su secuencia aunque no está claro si los miembros de una misma familia controlan procesos biológicos similares (Esquela-Kerscher y Slack, 2006).

La expresión de los microARNs se correlaciona con el desarrollo de determinados tipos de cáncer. Su expresión por tanto en tumores estará condicionada a si ejercen un papel oncogénico o supresor dependiendo del contexto en el que se exprese (tejido-específico). Estos son algunos ejemplos de microARNs implicados en cáncer:

MicroARN	Implicación en cáncer	Gen diana	Efectos de su expresión
let-7	Disminuido en cáncer de pulmón y colon	<i>H-Ras</i> , <i>N-Ras</i> , <i>K-Ras</i> , <i>c-Myc</i>	Inhibición de crecimiento celular
miR-15a miR-16	Disminuidos en leucemia linfocítica crónica (LLC)	Bcl2	Apoptosis
miR-21	Sobreexpresado en cáncer de mama, glioblastoma, LLC y cáncer cervical.	PTEN TPM 1 <i>Spry2</i>	Inducción crecimiento células tumorales. Inhibición apoptosis. Metástasis
miR-34a	Disminuido en cáncer de pulmón, colon y neuroblastomas.	CDK4 E2F3 Bcl2	Inducción de la apoptosis mediada por p53
miR-34b/c	Disminuido en tumores con pérdida de p53	CDK6 c-Myc	Inducción de la apoptosis mediada por p53 o represión de factores antiapoptóticos
miR-122	Disminuido en carcinoma hepatocelular humano	Bcl-w	Apoptosis
miR-130a	Disminución de angiogénesis por inhibición factores proangiogénicos	GAX HOXA5	Regulador de angiogénesis
miR-155	Sobreexpresado en LLC, linfomas y cáncer de mama	Ang II TP53INP1	Regulador de expresión de citoquinas. Inhibición apoptosis
miR-200	Disminuido en carcinomas metastáticos	Zeb1, Zeb2	Regulador TEM
miR-221	Sobreexpresado en glioblastoma y cáncer de próstata y páncreas	p27 c-Kit	Promueve proliferación celular

miR-335	Disminuido en cáncer de mama metastásico	SOX-4 Tenascina-C	Supresor metastásico. Inhibe metástasis en hueso y pulmón
miR-106a, 19b, 92, 20b y 363	Altamente sobreexpresados en leucemias y en cáncer de colon, páncreas y próstata	<i>Rb</i> RbP1-like HIPK3	Reguladores de monocitopoyesis
miR-17-5p, 18, 19a, 20a y 92	Sobreexpresión en linfomas, y en cáncer de pulmón	E2F1 TSP-1 CTGF	Disminución de apoptosis

Tabla 1. MicroARNs implicados en cáncer (revisado de Esquela-Kerscher y Slack, 2006; Gartel y Kandel, 2008; Schickel y col., 2008; Zhang y col., 2007).

Recientemente se ha demostrado que determinados microARNs juegan un papel funcional de gran importancia en el desarrollo de la epidermis y el folículo piloso de ratón. La desregulación de miR-141, miR-429 y de miembros de las familias miR-200, miR19 y miR20 provoca defectos en la morfogénesis de la piel y en procesos de diferenciación y apoptosis (Yi y col., 2006). Se ha demostrado que la familia miR-200 inhibe los procesos de transición epitelio mesénquima por inhibición de los represores transcripcionales de E-cadherina, ZEB1 y ZEB2 (Korpal y col., 2008). Se ha comprobado además la implicación en la homeostasis de epitelios estratificados de miR-203, que regula p63 viéndose afectado el potencial proliferativo de las células madre epidérmicas (Yi y col., 2008).

Se ha descrito ampliamente una familia de miARNs, miR-34a-c, implicada en el bloqueo del ciclo celular y en la apoptosis. Los genes que codifican a los miembros de esta familia son diana transcripcional directa de p53, por lo que su expresión depende del estado funcional de esta proteína. Ante daños en el ADN o estrés celular se induce la expresión de estos miARNs que actúan reprimiendo la expresión de determinados factores implicados en proliferación y supervivencia celular como son CDK6, E2F3 y Bcl2 entre otros (He y col., 2007a; He y col., 2007b). En relación con la implicación de los microARNs en el control del ciclo celular se ha descrito que c-Myc activa la expresión de seis microARNs de un mismo grupo en el cromosoma 13. Entre estos

microARNs se encuentran miR-17-5p y miR-20a que regulan negativamente la expresión de E2F1. Además, c-Myc interviene en la progresión del ciclo celular por inducción de E2F1. Por tanto c-Myc actúa simultáneamente, por una parte activando la transcripción de E2F1 y por otra, impidiendo su traducción por acción de ambos microARNs (O'Donnell y col., 2005).

4. pRb. Implicación en ciclo celular y su papel como supresor tumoral

Rb fue el primer gen supresor tumoral identificado y aislado de un tipo de tumor hereditario, el retinoblastoma (Friend y col., 1986). El producto del gen de retinoblastoma, pRb, inhibe la proliferación celular principalmente a través de su interacción con factores de transcripción de la familia de E2F, bloqueando su activación y regulando la transcripción de genes requeridos para la replicación celular (Dyson, 1998). Por tanto, la inactivación de pRb es necesaria para favorecer los procesos de proliferación celular tanto en condiciones normales como en patológicas (cáncer), conduciendo a la activación funcional de los factores E2F (Nevins, 1998).

pRb y la vía de retinoblastoma son de gran importancia en el control del ciclo celular ya que se encargan de regular la transición de la fase G1 a la S. Cuando pRb se une a los factores E2F en la fase G1, impide la transcripción de genes esenciales para la fase S. La inactivación de pRb o de su vía de señalización permitiría la progresión del ciclo. Se ha descrito que pRb puede ser inactivado por distintos mecanismos:

- Inactivación genética de *Rb*, tal y como se observa en el caso del retinoblastoma.

- A través de la acción de ciertas oncoproteínas virales, que promueven proliferación celular: antígeno T de SV40, proteína E1A de adenovirus y proteína E7 de papilomavirus humano. En este último caso se promueve la degradación de pRb por la vía del proteosoma.

- A través de procesos de fosforilación mediados por complejos de ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas (CDK). Mediante la fosforilación de pRb los factores

E2F quedan libres e inician la transcripción de sus genes diana permitiendo la progresión del ciclo celular. Este sistema está regulado por los inhibidores de las quinasas dependientes de ciclinas (CKIs), que inhiben la acción de las CDKs. De esta forma pRb no se fosforila, inhibiéndose así la transcripción de los genes dependientes de E2F. Por tanto, la sobreexpresión o mutación de ciclinas, CDKs o inactivación de CKIs, conduce a la progresión del ciclo celular y a que se produzcan alteraciones patológicas como es el caso del cáncer.

Si bien el tumor clásico derivado de la mutación del gen de *Rb* es el retinoblastoma, se han encontrado mutaciones en el gen *Rb* en otros tumores humanos, tales como osteosarcomas, cáncer de pulmón (SCLC), próstata o mama (Bookstein y col., 1990; Harbour y col., 1988; Lee y col., 1988). Cabe resaltar que la práctica totalidad de los cánceres esporádicos humanos presentan alteraciones en las vías de señalización relacionadas con la inactivación funcional de pRb (sobreexpresión de ciclinas, CDKs, inactivación o mutación en p16, etc.).

La familia de retinoblastoma está constituida por tres miembros: pRb, p107 y p130. p107 y p130 están funcionalmente relacionadas con pRb y poseen una gran homología entre ellas (Ewen y col., 1991; Hannon y col., 1993). Las tres proteínas que componen la familia de retinoblastoma presentan características comunes: son reguladoras del ciclo celular controlando la transición G1-S, regulan la transcripción de ciertos genes debido a su unión a factores de transcripción E2F y son capaces de interaccionar con oncoproteínas virales. La actividad de las tres proteínas se regula por la fosforilación mediada por CDKs. La diferencia existente entre ellas radica en sus patrones de expresión y en su capacidad de unión a los distintos miembros de factores E2F (Classon y Dyson, 2001).

Las proteínas de la familia de retinoblastoma juegan un papel fundamental en la salida irreversible del ciclo celular previa al comienzo de diferenciación celular (fig. 11). pRb y p130 aumentan sus niveles en células en diferenciación, mientras que los de p107 disminuyen. El papel de las proteínas pRb, p107 y p130 en relación a su asociación a factores E2F es de gran importancia en la regulación de la homeostasis epidérmica

(Lara y col., 2008a; Ruiz y col., 2003). Recientes estudios en modelos murinos deficientes en pRb en epidermis han demostrado que, en ausencia de pRb, es p107 la proteína que compensa sus funciones, ejerciendo un papel supresor tumoral fundamental mediado por mecanismos apoptóticos dependientes de p53 (Lara y col., 2008b; Ruiz y col., 2004).

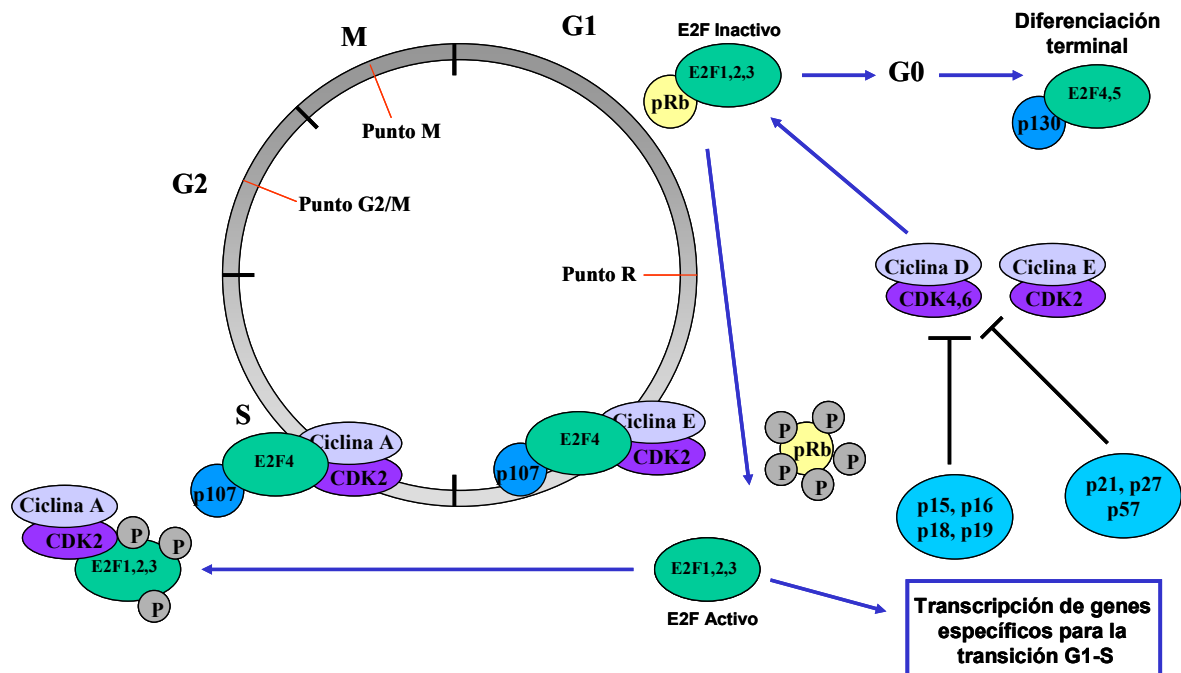


Figura 11. Ciclo celular. Representación esquemática del ciclo celular y de las fases que lo componen. Implicación de la familia de retinoblastoma en la parada del ciclo celular por unión a factores E2F. La progresión del ciclo se debe a la fosforilación de Rb mediada por complejos CDKs lo que permite la liberación de los factores E2F.

5. p53. Implicación en ciclo celular y apoptosis. Papel como supresor tumoral

p53 es un factor de transcripción codificado por el gen *Tp53* que se induce como respuesta al daño celular, hipoxia o activación oncogénica, y que promueve la regulación de un programa de expresión génica complejo que permite la parada del ciclo celular, induce apoptosis o senescencia, o induce ciertos procesos de reparación del ADN (Vousden y Lu, 2002; Wahl y Carr, 2001). Alrededor de un 50% de cánceres humanos presentan mutaciones en *Tp53*, lo que refuerza su función como supresor

tumoral. No obstante, a diferencia de otros genes supresores de tumores, las alteraciones en *Tp53* tienen un carácter dominante, debido a que la función es ejercida por tetrámeros de proteína, en los que la mera presencia de un elemento mutado inactiva el complejo. p53 ha sido calificada como guardián del genoma: ante daños en el ADN, p53 se induce, e induce a su vez la expresión de proteínas reguladoras como p21, que inhibe a las CDKs, con lo que se produce la parada del ciclo celular (fig. 12). Bajo ciertas circunstancias (por ejemplo daño masivo en el genoma) p53 es capaz de inducir apoptosis e impide a las células su entrada en ciclo en aquellas condiciones que puedan generar o perpetuar daños en el ADN (Harris y Levine, 2005; Oren, 2003). Entre los genes inducidos por p53 y que promueven la apoptosis se pueden citar *Noxa* y *Puma*, así como *Bax*, que es un miembro de la familia de proteínas Bcl-2 (fig. 12). Algunos estudios en cultivos celulares sugieren que p53 puede inducir apoptosis por mecanismos independientes a la transcripción, por medio de la activación directa de proteínas proapoptóticas o por inactivación de proteínas antiapoptóticas (Chipuk y col., 2004; Marchenko y col., 2000; Mihara y col., 2003).

Recientemente se han descrito otras funciones para p53 que afectan al metabolismo celular actuando como antioxidante (Bensaad y col., 2006), así como en procesos de autofagia (Crighton y col., 2006).

La función de p53 está altamente regulada. Uno de los genes inducidos por p53 es *Mdm2*, que codifica una ubiquitina-ligasa que actúa como regulador negativo de p53 al promover su degradación por el proteosoma (Harris y Levine, 2005; Juven-Gershon y Oren, 1999). Este bucle de regulación bidireccional es esencial para restablecer la función normal de p53, evitando su acumulación excesiva en las células. MdmX está también inducido por p53, pero no posee la actividad ubiquitina-ligasa de Mdm2 y ejerce su acción inhibidora a través de su unión al dominio de transactivación de p53 (Marine y Jochemsen, 2005). En situaciones de estrés celular, MdmX interacciona con Mdm2 inhibiendo su unión con p53 y por tanto su degradación (Jackson y Berberich, 2000). Entre los activadores moleculares de la acción de p53 se encuentra p19^{Arf} (p14^{Arf} en humanos), un potente supresor de tumores codificado por el locus INK4a/ARF e

inducido por factores E2F. p19^{Arf} se une a Mdm2 impidiendo su unión a p53 y permitiendo así la respuesta mantenida de p53 (fig. 12) (Kamijo y col., 1998; Pomerantz y col., 1998).

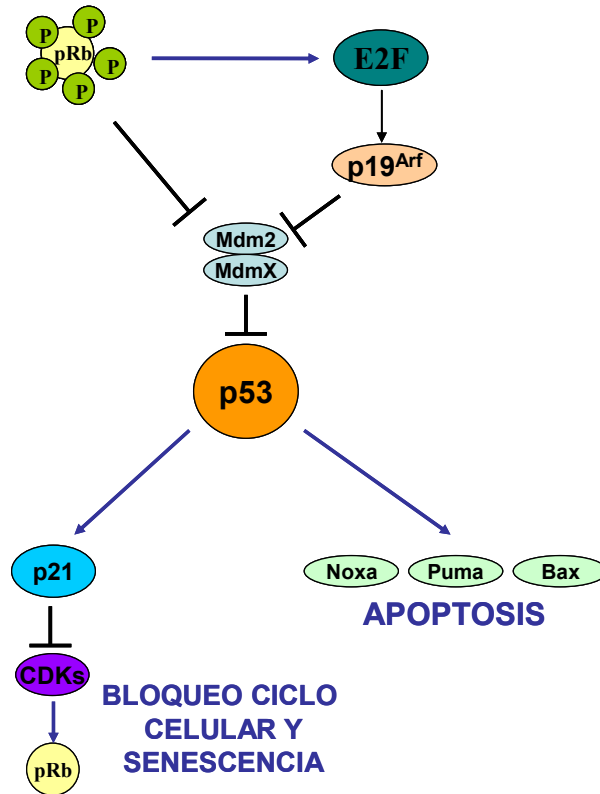


Figura 12. Vías inducidas por la activación de p53. La inactivación de pRb y la liberación de los factores E2F induce bloqueo del ciclo celular, apoptosis y senescencia mediados por p53.

La familia de p53 también está formada por los miembros p63 y p73. Los tres miembros de la familia guardan homología en tres dominios: El dominio N-terminal de activación transcripcional (TAD), el dominio central de unión al ADN (DBD) y el dominio C-terminal de oligomerización (OD). p63 y p73 presentan entre ellos más homología que con p53. Ambas proteínas se pueden presentar como dos isoformas según contengan el dominio TAD completo (isoforma TA) o carezcan de él (isoforma ΔN). En general, las isoformas TA de p63 y p73 se comportan como p53, mientras que las isoformas ΔN se comportan de forma opuesta. No es común encontrar mutaciones de p63 o p73 en cánceres humanos, aunque modelos murinos deficientes en alguna de las proteínas presentan defectos en el desarrollo e incremento en la tumorigénesis. Sí que existen evidencias de que ambas proteínas median la respuesta celular ante daños en el ADN, por lo que presentan cierta actividad supresora tumoral *in vivo* (Li y Prives,

2007). A pesar de estas evidencias aún se desconoce el verdadero papel de las proteínas p63 y p73 en los procesos tumorigénicos epiteliales.

6. Interacción funcional entre pRb y p53 en la supresión tumoral

Numerosas evidencias obtenidas a lo largo de los últimos años han demostrado la existencia de una relación funcional entre pRb y p53. Se producen multitud de interacciones en las vías de señalización controladas por pRb y p53 que podrían explicar la implicación de ambos supresores en procesos de carcinogénesis y proporcionar así las bases para posibles terapias específicas frente a los tumores (Sherr y McCormick, 2002). La apoptosis en diversos tejidos de determinados modelos murinos deficientes en *Rb* disminuye en ausencia de p53 (Macleod y col., 1996; Morgenbesser y col., 1994). Por otro lado, se ha comprobado que la inactivación de pRb conduce a la activación de p53 o a regular su actividad apoptótica mediante su unión a Mdm2. A pesar de esto, en el desarrollo de retinoblastoma se produce un aumento de MdmX que inactiva p53 (Laurie y col., 2006). En determinadas situaciones de estrés, como las producidas por la actuación de ciertos oncogenes, el aumento de E2F1 conduce a un aumento en la expresión de p19^{Arf} que es capaz de romper la interacción Mdm2-p53. Como resultado queda reprimida la función de Mdm2 permitiendo la respuesta apoptótica mediada por p53 (Chang y col., 2007). No obstante, existen evidencias experimentales que demuestran que E2F también puede activar a p53 por mecanismos independientes de p19^{Arf} (Russell y col., 2002).

7. Modelos animales para el estudio de *Rb* y *Trp53* en epidermis y en cáncer

El ratón deficiente en *Rb* es letal alrededor del día 13,5-15,5 de gestación, lo que impide el estudio de tejidos de desarrollo embrionario tardío o durante la vida adulta. La morfogénesis de la epidermis comienza alrededor del día 14,5 de gestación (Byrne y col., 1994), lo que ha imposibilitado el estudio de la función de pRb en este tejido. Los animales *Rb*^{-/-} presentan un aumento en la proliferación y la apoptosis en retina, sistema nervioso central e hígado, así como procesos de hematopoyesis defectuosa, mientras que los animales heterocigotos (*Rb*^{+/-}) desarrollan tumores espontáneos en el lóbulo intermedio de la glándula pituitaria (Clarke y col., 1992; Jacks y col., 1992; Lee y col., 1992).

Para estudiar el papel de pRb en epidermis se usó el sistema de recombinación específica de tejido Cre/LoxP (Sauer y Henderson, 1988) (fig. 13). Animales portadores de secuencias LoxP flanqueando el exón 19 del gen *Rb* se cruzaron con una línea transgénica que expresa Cre bajo el promotor de la queratina 14, cuya expresión se restringe a los queratinocitos basales de epitelios estratificados (Byrne y col., 1994; Vooijs y col., 2002). El fenotipo resultante en piel de estos animales (*Rb*^{loxP/loxP};K14^{Cre}) se caracteriza por hiperplasia e hiperqueratosis moderada, debidas a un aumento en la proliferación y alteración en la diferenciación. No obstante, el fenotipo de estos ratones es limitado y no desarrollan tumores espontáneos, lo que podría indicar la existencia de una compensación funcional parcial por otra(s) proteína(s) de la familia o relacionadas (Ruiz y col., 2004). La ausencia de tumores espontáneos, a pesar del aumento de proliferación en la epidermis, condujo a la realización de protocolos de carcinogénesis química en piel en este modelo murino. No se obtuvieron tumores tras la aplicación de DMBA en ausencia de TPA, indicando que la pérdida de pRb no aumenta la sensibilidad a carcinógenos en epidermis. Tampoco se desarrollaron tumores con la aplicación sólo de TPA, lo que indica que la pérdida de pRb no actúa como factor iniciador de la carcinogénesis (Ruiz y col., 2005). Por otra parte, aplicando DMBA y TPA, se observó que los animales *Rb*^{loxP/loxP};K14^{Cre} desarrollan un menor

número de papilomas que, además, presentan un menor tamaño respecto al control (Ruiz y col., 2005). Esta característica se asocia al aumento en la apoptosis por inducción de p53 debida, probablemente, a la expresión sostenida de E2F1 en ausencia de pRb. Sin embargo, el análisis histológico de estos tumores mostró una mayor tasa de malignización. Este hecho sugiere que, en ausencia de pRb, se produce una presión selectiva que deriva en la pérdida prematura de p53 y por lo tanto a la malignización temprana (Ruiz y col., 2006).

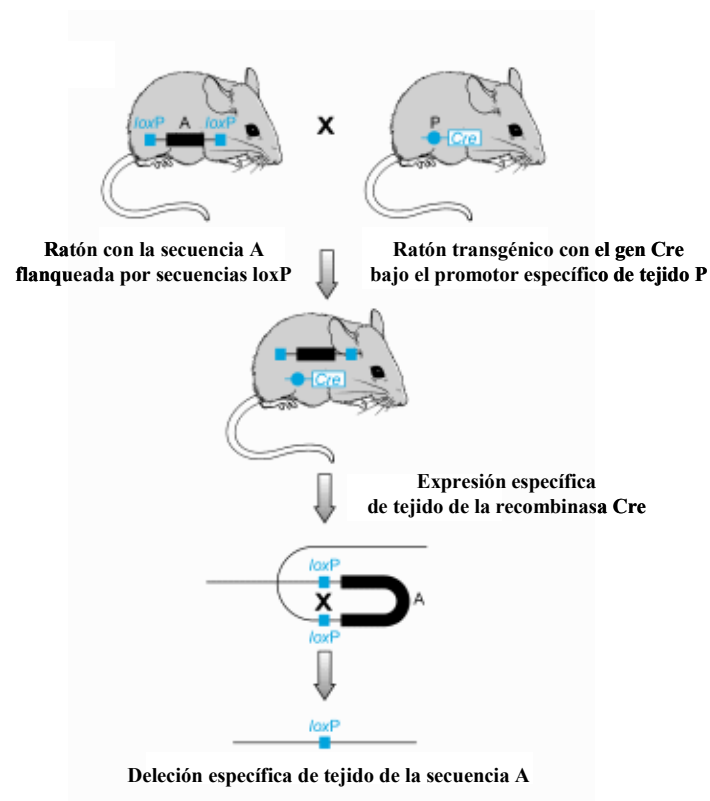


Figura 13. Sistema de recombinación específica de tejido Cre/LoxP. Esquema de la recombinación específica mediada por la recombinasa Cre a través del reconocimiento de las secuencias LoxP que flanquean una secuencia génica de interés (A). P: Promotor específico de tejido.

Para investigar el papel del gen p53 en el desarrollo tumorigénico se han generado diversos modelos animales deficientes. La mayoría de modelos mutantes para p53 son susceptibles en mayor o menor grado a desarrollar tumores espontáneos de diversos tipos según el fondo genético del animal, la naturaleza de la mutación, la

presencia o no de formas salvajes de p53 o la combinación con otros genes asociados a cáncer en el modelo (Attardi y Donehower, 2005). Los animales homocigotos deficientes en p53 son viables y aparentemente normales, pero desarrollan tumores espontáneos tipo sarcoma o linfoma alrededor de los 6 meses de edad. En el caso de animales heterocigotos la aparición de tumores espontáneos se retrasa hasta aproximadamente 9 meses de edad, lo que indica que la pérdida de un alelo de p53 es suficiente para predisponer al animal al desarrollo de tumores (Donehower y col., 1992).

Usando el sistema Cre/LoxP se han generado modelos condicionales que permiten obtener la delección específica en epidermis del gen *Trp53* a través de cruces con transgénicos K14cre de forma análoga a la obtención de modelos deficientes en *Rb* en piel. Este modelo desarrolla tumores espontáneos de mama y piel (Jonkers y col., 2001), lo que permite un amplio margen de estudio de las consecuencias fenotípicas resultantes a partir de mutaciones adicionales en genes implicados en progresión tumoral y metástasis. Así se ha demostrado la cooperación entre *Brca2* y p53, E-cadherina y p53 etc, (Derksen y col., 2006; Jonkers y col., 2001; Liu y col., 2007). De forma análoga se ha demostrado la cooperación funcional entre pRb y p53 en la supresión tumoral de determinados tejidos: retina, cerebelo, pulmón, vejiga y próstata. No obstante, a pesar del gran número de evidencias indirectas, se desconoce si existe una cooperación funcional entre la deficiencia de *Rb* y *Trp53* en epidermis.

Objetivos

Debido a la importancia de los genes *Rb* y *Trp53* en procesos implicados en el control de la proliferación, diferenciación y carcinogénesis en diferentes tejidos, y puesto que aproximadamente el 80% de las neoplasias son de origen epitelial, el objetivo primordial de la realización de este trabajo es establecer, desde el punto de vista funcional, la consecuencia de la ausencia de estos genes supresores de tumores en la fisiopatología de la epidermis y en los procesos de carcinogénesis. Para ello se pretende abordar los siguientes objetivos:

1.- Analizar la interferencia funcional de *Rb* y *Trp53* en epidermis de ratón.

a) Estudiar el papel de p53 en epidermis de ratón y en tumorigénesis epidérmica mediante la caracterización del modelo murino deficiente en *Trp53* en epidermis, *Trp53^{ΔCE}*.

b) Estudiar los mecanismos de cooperación entre pRb y p53 en la supresión tumoral mediante la caracterización del modelo murino deficiente en *Rb* y *Trp53* en epidermis, *Rb^{ΔCE};Trp53^{ΔCE}*.

2.- En el caso de que se produzca algún tipo de proceso tumorigénico en los animales *Trp53^{ΔCE}* y *Rb^{ΔCE};Trp53^{ΔCE}*, analizar los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo tumoral. Realizar además un estudio genómico de los tumores y estudiar posibles fenómenos de transición epitelio-mesénquima y metástasis y los mecanismos moleculares que inducen su desarrollo.

Materiales y métodos

1. Animales de experimentación

Los animales deficientes en pRb y en p53 en epidermis ($Rb^{F19/F19}$; K14cre y $Trp53^{F2-10}$; K14cre) fueron generados en fondo genético FVB (Jonkers y col., 2001; Marino y col., 2000) y generosamente cedidos por el Dr. Anton Berns (Netherlands Cancer Institute). Para la obtención de los animales doble deficientes en Rb y p53 ($Rb^{F19/F19}$; $Trp53^{F2-10}$; K14cre, a partir de ahora denominados como $Rb^{\Delta CE}; Trp53^{\Delta CE}$), ambos modelos fueron cruzados en nuestro laboratorio entre sí, y entre formas heterocigotas, dando lugar a todas las combinaciones alélicas necesarias para nuestro estudio, denominadas a partir de este momento: $Rb^{\Delta CE}; Trp53^{\Delta CE}$, $Rb^{\Delta CE}; Trp53^{\Delta CE/+}$, $Rb^{\Delta CE}; Trp53^{+/+}$ (o $Rb^{\Delta CE}$), $Rb^{\Delta CE/+}; Trp53^{\Delta CE}$, $Rb^{\Delta CE/+}; Trp53^{\Delta CE/+}$, $Rb^{\Delta CE/+}; Trp53^{+/+}$, $Rb^{+/+}; Trp53^{\Delta CE}$ (o $Trp53^{\Delta CE}$), $Rb^{+/+}; Trp53^{\Delta CE/+}$, $Rb^{+/+}; Trp53^{+/+}$ (animales control). Para evitar problemas de recombinación aleatoria en posibles secuencias pseudo LoxP en el genoma murino, se mantiene siempre la heterocigosis en la recombinasa cre.

Los animales fueron mantenidos alrededor de un periodo máximo de 20 meses en un animalario con ciclo de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad, temperatura de 22-24°C y alimentados con pienso estándar. Fueron sacrificados en atmósfera de CO₂ en el momento en que mostraban deterioro a causa del desarrollo tumoral, cumpliendo en todo momento los criterios del CEEA del CIEMAT y las recomendaciones de FELASA. El volumen de los tumores aislados ($Trp53^{\Delta CE}$, n = 23; $Rb^{\Delta CE}; Trp53^{\Delta CE}$, n = 43) se calculó según la fórmula: $V = (4/3)\pi * (altura/2)^2 * (base/2)$.

2. Extracción de ADN genómico

El aislamiento de ADN genómico se llevó a cabo a partir de biopsias de cola de ratones de aproximadamente 10 días de vida. Se usó el siguiente protocolo de extracción de ADN genómico (Laird y col., 1991): El tejido se digirió en 700 µl de tampón de lisis (100 mM Tris-HCl pH: 8.5, 5 mM EDTA, 0.2% SDS, 200 mM NaCl y 100 µg proteinasa K/ml) a 55°C en agitación durante toda la noche. Una vez digerida la cola, se precipitó el ADN con isopropanol (en proporción 1:1) y se lavó en etanol 70% para eliminar las sales residuales. Una vez seco, el ADN genómico se resuspendió en 500 µl

de buffer TE (10 mM Tris HCl pH 7.5, 1 mM EDTA pH: 8). Para las reacciones de PCR siempre se usó 1 µl del ADN genómico obtenido.

3. Genotipado de animales

El genotipado de los animales se realizó por PCR mediante la siguiente reacción:

ADN	1 µl
Tampón 10X	2 µl
dNTPs (2 mM)	2 µl
Oligonucleótidos (10 µM)	1 µl
MgCl ₂ (50 mM)	1 µl
Enzima Taq polimerasa (Promega)	0,2 µl
H ₂ O destilada	Hasta 20µl

El programa de reacción que se usó fue el siguiente:

- 5 minutos 94°C
 - 30 segundos 94°C
 - 30 segundos 58°C
 - 50 segundos 72°C
 - 10 minutos 72°C
- } 29 ciclos

Los oligonucleótidos utilizados para el genotipado de los diferentes animales se describen en el siguiente cuadro:

Gen	Oligonucleótidos	Secuencia	Fragmento amplificado	Tamaño de banda
Rb	Rb18	GGCGTGTGCCATCAATG	<i>Alelo Rb^{WT}</i> (Rb18 + Rb19)	680 pb
	Rb19	AACTCAAGGGAGACCTG	<i>Alelo Rb^{Floxeado}</i> (Rb18 + Rb19)	748 pb
			<i>Alelo Rb^{Al9}</i> (Rb18 + Rb19)	300 pb
p53	p53 10R	GAAGACAGAAAAGGGGAGGG	<i>Alelo p53^{WT}</i> (p53;10F+p53;10R)	431 pb
	p53 10F	AAGGGGTATGAGGGACAAGG	<i>Alelo p53^{Floxeado}</i> (p53;10F+p53;10R)	584 pb
	p53 1F	CACAAAAACAGGTAAACCCAG	<i>Alelo p53^{Δ2-10}</i> (p53;1F+p53;10R)	612 pb
Cre	Cre1	CGATGCAACGAGTGATGAGGTTC	<i>Alelo Cre</i> (Cre1 + Cre2)	400 pb
	Cre2	GCACGTTACCGGCATCAAC		

Los productos de PCR se resolvieron en geles de agarosa/TBE 0.5X (89 mM Tris-borato, 2 mM EDTA, pH 8) al 1,8%. En cada calle del gel se cargaron 15µl del producto de PCR, mezclados con colorante (Sacarosa 7%, azul de bromofenol 0,04% y azul de xilenocianol 0,04%), y se corrieron a 90V durante al menos 1 hora. Los fragmentos de ADN se visualizaron con bromuro de etidio (1µg/ml) en un transiluminador de luz ultravioleta, determinando así, la existencia de los correspondientes fragmentos. En todos los casos se usó un marcador de bajo peso molecular (marcador IX, Roche).

4. Análisis histológico e inmunohistoquímico

Las muestras histológicas se fijaron en formaldehído 4% en PBS o en etanol 70% y fueron embebidas en parafina. Los cortes histológicos (5 µm de espesor), realizados con microtomo (Leica), se desparafinaron y se tiñeron con hematoxilina/eosina (Sigma) para realizar el análisis histológico, o se procesaron para inmunohistoquímica o inmunofluorescencia. En el caso de los cortes por congelación (8 µm de espesor), las muestras se embebieron frescas en medio OCT (Bayer) (Tissue-Teck) y se procesaron mediante congelación a -20°C para su uso en el criostato (Leica).

Para el análisis inmunohistoquímico se utilizaron muestras fijadas en formaldehído 4% PBS o en etanol 70%. Tras el desparafinado, y en el caso de muestras fijadas en formaldehído, se hizo un tratamiento previo con citrato sódico 10 mM seguido de microondas para desenmascarar los epítomos. Posteriormente, y en todos los casos, las muestras se preincubaron durante 30 minutos con PBS-5% de suero fetal de caballo para bloquear uniones inespecíficas. Las muestras se incubaron con los correspondientes anticuerpos primarios durante toda la noche a 4°C y con los secundarios durante dos horas a temperatura ambiente. Entre todas las incubaciones se realizaron al menos tres lavados de PBS.

Para el análisis inmunohistoquímico, y previamente a la incubación con el anticuerpo, se realizó una incubación con peróxido de hidrógeno al 3% para bloquear la peroxidasa endógena. La detección del anticuerpo se realizó mediante el sistema avidina/estreptavidina-peroxidasa (ABC Kit, Vectastain). La reacción se visualizó añadiendo diaminobencidina como sustrato cromógeno y H₂O₂ (Peroxidase Substrate

Kit DAB, Vector Laboratories). Las preparaciones se contratiñeron con hematoxilina y se montaron con Eukitt. La visualización se llevó a cabo en microscopio óptico convencional.

En el caso de dobles inmunofluorescencias la incubación de los anticuerpos primarios o secundarios se realizó de forma simultánea. El montaje se realizó con moviol (Hoechst) al que se le añadió DAPI (200µg/ml) para la detección de los núcleos celulares. La visualización se llevó a cabo en microscopio Zeiss Axioplan2 *imaging*, equipado con fuente de epifluorescencia y filtros adecuados. Las imágenes fueron capturadas por una cámara digital AxioCam MRm y visualizadas por el programa AxioVision Rel.4.6. El procesamiento de las imágenes se realizó mediante el programa Corel Photo-Paint 11.

Los anticuerpos primarios y secundarios empleados en las diferentes tinciones inmunohistoquímicas o inmunofluorescencias y las diluciones se enumeran en la siguiente tabla:

ANTICUERPOS PRIMARIOS			
ESPECIFICIDAD	ORIGEN	CASA COMERCIAL	DILUCIÓN
K5	Policlonal de conejo	Covance	1/1000
K10 (K8.60)	Monoclonal de ratón	SIGMA	1/100
BrdU	Monoclonal de ratón	Roche	1/50
CD45.2 (Ly 5.2)	Monoclonal de ratón	BD Pharmingen	1/50
Mac-1 (CD11-B)	Monoclonal de rata	BD Pharmingen	1/50
Gr-1(Ly-6G;LY6C)	Monoclonal de rata	BD Pharmingen	1/50
α -tubulina	Monoclonal de ratón	SIGMA	1/100
γ -tubulina	Policlonal de conejo	Abcam	1/200
P-Chk1 (S345)	Policlonal de conejo	Abcam	1/50
P-Chk2 (T68)	Policlonal de conejo	Abcam	1/50
K6	Policlonal de conejo	Covance	1/1000
K17	Policlonal de conejo	Cedido por el doctor P. Coulombe	1/500
K15 (LHK15)	Monoclonal de ratón	Neomarkers	1/50
P-Akt (Ser 473) (IHC specific)	Policlonal de conejo	Cell Signaling	1/50
P-ERK1/2	Monoclonal de ratón	Santa Cruz	1/500
Cyc-D1 (SP4)	Monoclonal de conejo	Neomarker	Ready to use
Foxo3A	Policlonal de conejo	Upstate Biotech	1/500
CD31 (PECAM1)	Monoclonal de rata	BD Pharmingen	1/50
α Sma	Monoclonal de ratón	SIGMA	1/200
E-cadherina	Monoclonal de ratón	Transduction Lab	1/50
Vimentina	Monoclonal de ratón	Biogenex	1/10
Twist	Policlonal de conejo	Abcam	1/500
Snail1	Policlonal de conejo	Santa Cruz	1/500
FoxC2	Policlonal de cabra	Abcam	1/50
Sprouty2	Policlonal de conejo	Santa Cruz	1/50

PTEN	Policlonal de conejo	Cedido por el doctor R. Pulido	1/200
P-Smad2/3 (Ser423/425)	Policlonal de conejo	Santa Cruz	1/50

ANTICUERPOS SECUNDARIOS			
ESPECIFICIDAD	CONJUGADO	CASA COMERCIAL	DILUCIÓN
Rata	FITC	Jackson Immunoresearch	1/50
Conejo	Biotina	Jackson Immunoresearch	1/1000
	FITC	Jackson Immunoresearch	1/50
	Texas Red	Jackson Immunoresearch	1/500
Ratón	Biotina	Jackson Immunoresearch	1/1000
	FITC	Jackson Immunoresearch	1/50
	Texas Red	Jackson Immunoresearch	1/500
Cabra	Biotina	Jackson Immunoresearch	1/1000

5. Incorporación de BrdU *in vivo*

Para medir el grado de incorporación de BrdU en un tejido o tumor, se inyectó un total de 0,1 mg de solución de BrdU al 10 mg/ml, por gramo de peso del ratón. Una hora después de la inyección, se sacrificó al animal fijando los tejidos en formaldehído 4% en PBS o en etanol 70% e incluyéndolos después en parafina. Los cortes histológicos desparafinados se pretrataron una hora en HCl 2N para favorecer la desnaturalización del ADN y así detectar mejor la molécula de BrdU incorporada en el mismo. Tras este pretratamiento, el proceso de inmunohistoquímica o doble inmunofluorescencia junto con el anticuerpo anti-k5, se realizó tal y como se ha descrito anteriormente.

6. Detección de muerte celular mediante TUNEL

El análisis de células apoptóticas se realizó en tejidos fijados con formaldehído al 4% en PBS mediante la detección del nucleótido dUTP añadido por la enzima TdT (transferasa terminal de nucleótidos) en los extremos 3' de los fragmentos de ADN característicos de una célula en proceso de apoptosis. La detección de células apoptóticas se realizó mediante doble inmunofluorescencia con K5 utilizándose el kit *In situ Cell Death Detection, Fluorescein* (Boehringer Mannheim), en el que el tejido

desparafinado se incubó con una mezcla de la enzima TdT junto a dUTP asociado a fluoresceína. Tras la incubación se pudieron detectar las células marcadas en un microscopio de fluorescencia.

7. Western Blot

Los extractos proteínicos de piel o de tumores se obtuvieron respectivamente mediante homogeneización activa (mediante disgregación en mortero) o pasiva (mediante 3 ciclos de congelación/descongelación), en un tampón de lisis (Hepes 200mM pH7.9, glicerol 25%, NaCl 0.4M, EDTA 1mM y EGTA 1mM) suplementado con inhibidores de proteasas (aprotinina y leupeptina 5µg/ml, PMSF 1mM) y fosfatasas (ortovanadato sódico 1mM, NaF 20mM y pirofosfato sódico 1mM). Los lisados se centrifugaron a 12000 rpm a 4°C durante 10 minutos y los sobrenadantes se transfirieron a tubos fríos. La concentración de proteínas se determinó mediante el análisis colorimétrico de Bradford (BioRad) usando una curva estándar de rango 1µg/µl-25µg/µl de BSA.

Las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida-SDS a diferente porcentaje de poliacrilamida según los pesos moleculares de las proteínas a analizar. Se utilizaron 35 µg de proteína total usándose en todos los casos un marcador de peso molecular (New England Biolabs). El gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (Amershan Pharmacia Biotech) en cámara semihúmeda con medio de transferencia (Tris-Base 33mM, Glicina 194mM y Metanol 20%). La membrana se incubó con una solución de leche desnatada al 5% en TBS-Tween 0,5% (Tris-Cl 20mM, NaCl 137mM, pH 7,6) durante al menos 2 horas para el bloqueo de uniones inespecíficas. Tras ello, se incubó con los correspondientes anticuerpos primarios diluidos en BSA al 1% en TBS-Tween 0.5% dirigidos frente a las proteínas de interés.

Para detectar la unión del anticuerpo primario se usaron anticuerpos secundarios unidos a peroxidasa, concretamente, anticuerpos anti-IgG de especificidad variable (ratón, conejo, cabra). Por último, para visualizar la unión de los anticuerpos se usó un

kit de detección de luminiscencia basado en una reacción específica de la peroxidasa (Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce).

Los anticuerpos primarios y secundarios empleados para la detección de proteínas por western blot fueron los siguientes:

ANTICUERPOS PRIMARIOS			
ESPECIFICIDAD	ORIGEN	CASA COMERCIAL	DILUCIÓN
p65	Monoclonal de ratón	Santa Cruz	1/250
p50	Policlonal de conejo	Santa Cruz	1/250
p52	Policlonal de conejo	Santa Cruz	1/250
I κ B α	Policlonal de conejo	Santa Cruz	1/200
IKK α	Policlonal de conejo	Santa Cruz	1/250
IKK β	Policlonal de conejo	IMGenex	1/1000
IKK γ	Policlonal de conejo	Santa Cruz	1/250
Akt 1/2	Policlonal de cabra	Santa Cruz	1/500
P-Akt (Ser473)	Monoclonal de conejo	Cell Signaling	1/500
ERK-2	Policlonal de conejo	Santa Cruz	1/500
P-ERK1/2	Monoclonal de ratón	Santa Cruz	1/500
EGFR	Policlonal de conejo	Santa Cruz	1/200
Tyr-P	Monoclonal de ratón	Santa Cruz	1/1000
Erf1	Policlonal de cabra	Santa Cruz	1/200
Sprouty2	Policlonal de conejo	Santa Cruz	1/500
Snail1	Policlonal de conejo	Santa Cruz	1/1000
FoxC2	Policlonal de cabra	Abcam	1/500
Actina	Policlonal de cabra	Santa Cruz	1/1000

ANTICUERPOS SECUNDARIOS			
ESPECIFICIDAD	CONJUGADO	CASA COMERCIAL	DILUCIÓN
Cabra	Peroxidasa	Santa Cruz	1/10000
Conejo	Peroxidasa	Amersham Biosciences	1/5000
Ratón	Peroxidasa	Jackson ImmunoResearch	1/5000

8. Aislamiento de ARN total y microARN de pieles y tumores

Las pieles o muestras tumorales de los animales se extrajeron y conservaron en “RNA later” (Ambion) a -20°C. “RNA later” es un agente líquido que permite preservar la integridad del ARN en células y tejidos antes de su extracción impidiendo la degradación del ARN por ribonucleasas, así como la manipulación de la muestra biológica a temperatura ambiente. La extracción y purificación se hizo, para el caso de los análisis de biochips de expresión de pieles de animales recién nacidos,

simultáneamente de tres piezas de piel de individuos distintos del mismo genotipo (10 mg piel/animal). Para los análisis de biochips de pieles de animales adultos y de tumores, las muestras se extrajeron y purificaron individualmente. Las pieles o tumores se rompieron y homogenizaron con un sistema de molido (Mixer Mill 301, Retsch), purificándose posteriormente el ARN total usando un kit específico para tejidos con alto contenido en fibras (“RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit”, Qiagen). Para el caso de los análisis de arrays y RT-PCR de microARN, el ARN total con la fracción de microARN se extrajo utilizando el kit “miRNAeasy Mini Kit” de Qiagen que permite la separación de moléculas de ARN mayores de 18 nucleótidos.

La integridad del ARN total extraído se comprobó mediante el sistema Bioanalyzer (Agilent; Servicio de Genómica de la UCM), aceptándose como criterio de calidad un valor a partir de 1.4 de la relación 28S/18S o un valor a partir de 8 del *RNA integrity number* (RIN) como medida del grado de degradación de la muestra (Schroeder y col., 2006).

9. Análisis de expresión génica y de microARNs

El ARN aislado se envió a la Unidad de Genómica del Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca para su hibridación con el biochip de ratón de Affymetrix “MOE430A” que cuenta con 22690 sondas (para pieles de ratones recién nacidos) o “MOE430 2.0” con 45101 sondas (para muestras tumorales y pieles de ratones adultos). El ARN total con la fracción de microARN de tumores y pieles de ratones adultos se envió al Centro Nacional de Biotecnología de Madrid para su hibridación con el biochip de Exiqon, “miRCURY LNA microRNA Array v10.0” que cuenta con 4676 sondas.

Tras la hibridación con los biochips de Affymetrix, el programa informático GCOS de Affymetrix® generó archivos con la terminación “.CEL” que contienen el nivel de señal fluorescente de cada sonda según su intensidad tras la hibridación. A partir de ellos se obtuvieron los valores de intensidad de señal usando el método “Robust Multichip Análisis” (RMA) (Irizarry y col., 2003) (Bolstad y col., 2003). Para ello se eliminó la señal de fondo, y los valores de cada biochip se normalizaron usando el método de los cuartiles. Como resultado se obtiene una tabla con datos de intensidad de señal para cada una de las

sondas de Affymetrix de cada biochip. Ambas transformaciones se realizaron usando las utilidades de la página web “Gene Expression Profile Analysis Suite” (GEPAS) (<http://www.gepas.org>) (Montaner y col., 2006) del Centro de Investigación Príncipe Felipe de Valencia.

Los análisis estadísticos posteriores se hicieron con el programa informático “MultiExperiment Viewer” (MeV) (Saeed y col., 2003).

La selección de los genes expresados diferencialmente entre pieles de recién nacido control y mutantes se realizó mediante análisis de ANOVA ($p < 0.01$). De esta forma se seleccionaron 1435 genes. Los listados de los genes significativos implicados en la vía de PI3K/Akt, angiogénesis e inflamación (figuras 29, 32 y 19) fueron obtenidos a partir del análisis de enriquecimiento de procesos biológicos por Gene Ontology usando la herramienta “DAVID Functional Annotation” (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) (Dennis y col., 2003).

La expresión diferencial de las muestras tumorales respecto a las pieles control se obtuvo mediante el uso simultáneo de análisis de test de la T de Student (T-test) ($p < 10^{-7}$) y “Significance Analysis of Microarrays” (SAM) ($FDR < 10^{-3}$). De esta forma se seleccionaron 682 sondas en los tumores de ratón (371 con expresión aumentada y 311 con expresión disminuída). Usando la herramienta AILUN (Chen y col., 2007) se analizaron las sondas de ratón para mapearlas, cuando fue posible, a los genes humanos homólogos. El análisis de enriquecimiento de procesos biológicos (Gene Ontology) en los que las sondas seleccionadas están implicadas se realizó gracias a la herramienta “DAVID Functional Annotation”.

Los niveles de expresión génica y la información clínica de las muestras humanas analizadas en curvas de Kaplan-Meier se obtuvieron de la base de datos “Gene Expression Omnibus” (GEO) del NCBI a partir de los siguientes identificadores: GSE2658 (multiple myeloma_Zhan dataset), GSE4271 (astrocytoma_Phillips dataset) y GSE7390 (breast cancer_Desmedt).

Para estudiar la posible homología entre los tumores murinos y tumores humanos con determinadas características, hicimos análisis de solapamiento con firmas de cánceres humanos halladas en la base de datos Oncomine (www.oncomine.org), que

dispone de 360 estudios y abarca 40 tipos de cánceres humanos diferentes. Mediante el análisis “Molecular Concepts Map” (MCM) (Rhodes y col., 2007) se busca el solapamiento de los genes expresados diferencialmente entre dos firmas seleccionadas considerando un p-valor < 0.01 . Se consideró como criterio para seleccionar el tipo de estudio de cáncer humano usado en las comparativas, la existencia o no de mutación en p53 (“*Molecular Alteration*”) o los datos de mortalidad de los pacientes a corto plazo como criterio de malignidad tumoral (“*Prognosis*”).

Se empleó el análisis “Gene Set Enrichment Analysis” (GSEA) (Subramanian y col., 2005) para determinar el posible enriquecimiento en los tumores de nuestros ratones p53 de firmas génicas de células madre humanas obtenidas en estudios previos (tabla 1) (Ben-Porath y col., 2008). Los genes de dichas firmas se mapearon a genes de ratón usando la utilidad AILUN, y se analizó su posible enriquecimiento en la comparativa entre piel normal de ratón adulto y los tumores de los modelos *Trp53^{ΔCE}* y *Rb^{ΔCE};Trp53^{ΔCE}*.

Los marcadores epiteliales, mesenquimales y moduladores de TEM en las muestras tumorales se obtuvieron a partir de una selección por T-test ($p < 0.01$) de genes diferencialmente expresados en los tumores frente a las pieles control (1600 sondas). De forma manual se seleccionaron aquellos genes correspondientes a marcadores epiteliales, mesenquimales y moduladores de TEM (53 sondas). Un análisis mediante el uso de “Hierarchical clustering analysis” (HCL) agrupó las muestras tumorales en dos grupos, correspondientes a las formas más o menos indiferenciadas de los tumores. Posteriormente, mediante SAM ($FDR < 0.05$) para estas dos muestras, se obtuvieron los genes finalmente representados y que discriminan entre tumores indiferenciados y diferenciados (fig. 39).

La expresión diferencial de los microARNs entre muestras tumorales y pieles de ratones adultos control se obtuvo mediante análisis simultáneo con SAM ($FDR < 10^{-3}$) y T-test ($p < 10^{-2}$), seleccionándose 448 microARNs con expresión diferencial entre las muestras. Los mismos criterios fueron usados en el análisis entre muestras tumorales diferenciadas frente a indiferenciadas. La selección de microARNs implicados en

homeostasis epidérmica y metástasis se realizó manualmente utilizando bases de datos bibliográficas.

10. PCR a tiempo real de microARN

La transcripción reversa del ARN para la obtención de ADN complementario (ADNc) se realizó a partir de 1 µg de ARN total con la fracción de microARN obtenida de las pieles o tumores de los animales. Para ello se empleó el kit de retrotranscripción *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription kit* de Applied Biosystems usando los cebadores de retrotranscripción correspondientes a cada microARN a estudiar y que están suministrados en cada ensayo individual *TaqMan® MicroRNA Assay* (Applied Biosystems).

La amplificación por PCR a tiempo real se realizó usando los cebadores específicos para cada microARN suministrados en cada ensayo individual y el kit de amplificación *TaqMan® Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems). La reacción de PCR se realizó en el aparato de Applied Biosystems modelo 7300 y se cuantificó mediante el cálculo relativo del incremento del “cycle threshold” (Ct) entre las muestras problema y el control. Los valores de expresión de cada muestra fueron normalizados con los niveles de expresión del ARN pequeño nuclear U6B (RNU6B). La cuantificación de cada muestra se realizó por triplicado. El análisis de los niveles de expresión del microARN miR-21 entre los distintos grupos considerados se realizó mediante ANOVA (95% de confianza) y prueba F para medias en cada grupo.

11. Análisis por PET

Para el estudio por PET (“Positron Emission Tomography”) de la evolución de los tumores de los ratones y la aparición de metástasis, se inyectó intravenosamente a los animales, previo ayuno de 2-3 horas y anestesia, 0.2 ml de solución salina con un contenido de 300-400 µCi del radiofármaco 2-¹⁸F-fluoro-2-deoxi-D-glucosa (FDG, Molypharma). La adquisición de la imagen por PET se realizó en un equipo de microPET Argus RC (SUINSA), iniciándose a los 30 minutos de la inyección con FDG y

prolongándose unos 45 minutos. Las imágenes adquiridas fueron reconstituidas mediante análisis 3D-OSEM utilizando el software rPET_CT 4.7 Build 441 (SUINSA-HGUGM).

Resultados

1. Consecuencias fenotípicas de la deficiencia de p53 y de pRb y p53 en epidermis de ratón

1.1. Caracterización fenotípica de la epidermis deficiente en p53 y en pRb y p53

Con el objetivo de determinar si la ausencia de p53 modifica el fenotipo causado por la delección de *Rb* en piel, se realizaron análisis histológicos de la piel de los animales de los diferentes genotipos de estudio. La epidermis deficiente en pRb (*Rb*^{ΔEC}) (fig. 14 B) se caracteriza por hiperplasia moderada e hiperqueratosis (Ruiz y col., 2004). Por el contrario, la epidermis deficiente en p53 (*Trp53*^{ΔEC}) no presenta alteraciones fenotípicas con respecto a la de un animal control (fig. 14 A y C). De forma análoga, se observa que la pérdida de ambos alelos de *Trp53* no altera el fenotipo de piel característico de la deficiencia de pRb (*Rb*^{ΔEC};*Trp53*^{ΔEC}), no modificando de forma significativa la hiperplasia ni la hiperqueratosis (fig.14 D).

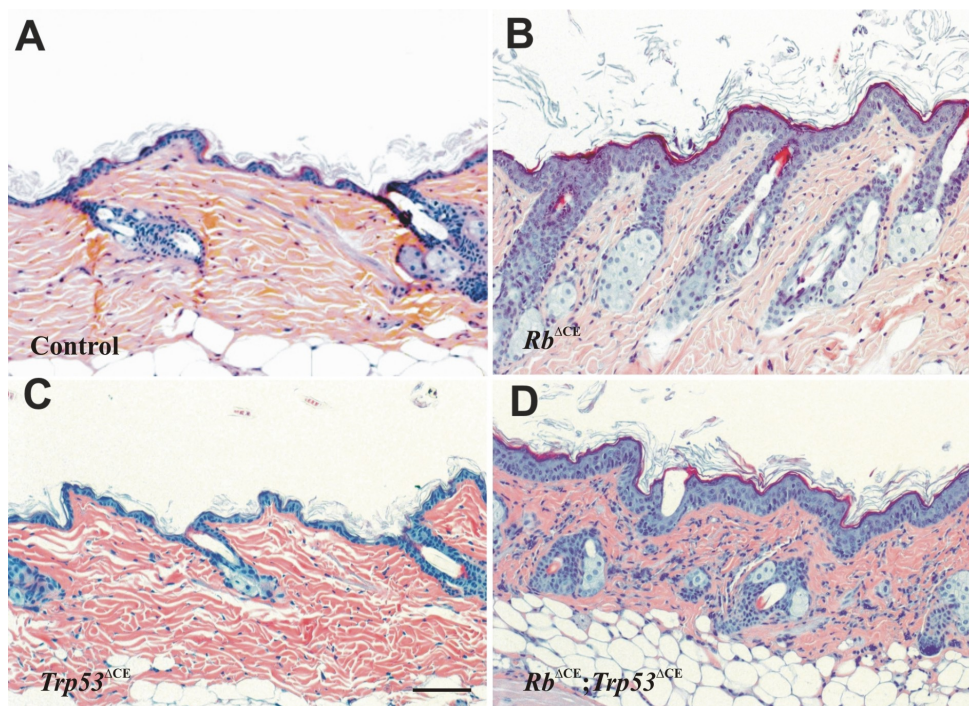


Figura 14. Fenotipo de la epidermis deficiente en *Trp53* y en *Rb* y *Trp53*. Tinciones de hematoxilina-eosina de piel de ratones adultos control (A), *Rb*^{ΔEC} (B), *Trp53*^{ΔEC} (C) y *Rb*^{ΔEC};*Trp53*^{ΔEC} (D). Se observa que la pérdida de *Rb* produce una moderada hiperplasia (B) que no se ve agravada por la pérdida de *Trp53* (D). Barra 100 μm.

Para comprobar la posible existencia de alteraciones en la diferenciación epidérmica de los animales $Trp53^{\Delta CE}$ y $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$, se analizó la expresión de determinados marcadores como son la queratina 5 (K5) y la queratina 10 (K10). Los animales $Rb^{\Delta CE}$ se caracterizan por una expresión expandida de la queratina K5 desde las capas basales hacia capas suprabasales, solapando su expresión esporádicamente con la queratina K10, típica de células suprabasales diferenciadas (Ruiz y col., 2004). El patrón de expresión de queratinas en los animales $Trp53^{\Delta CE}$ es idéntico al de la epidermis control (fig. 15 A y C), mientras que las alteraciones en la expresión en animales $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$, son iguales a las observadas en la epidermis $Rb^{\Delta CE}$ (fig. 15 B y D). Por lo tanto, se observa que la pérdida de p53 en epidermis no produce alteraciones fenotípicas ni agrava el fenotipo que presenta la piel deficiente en pRb.

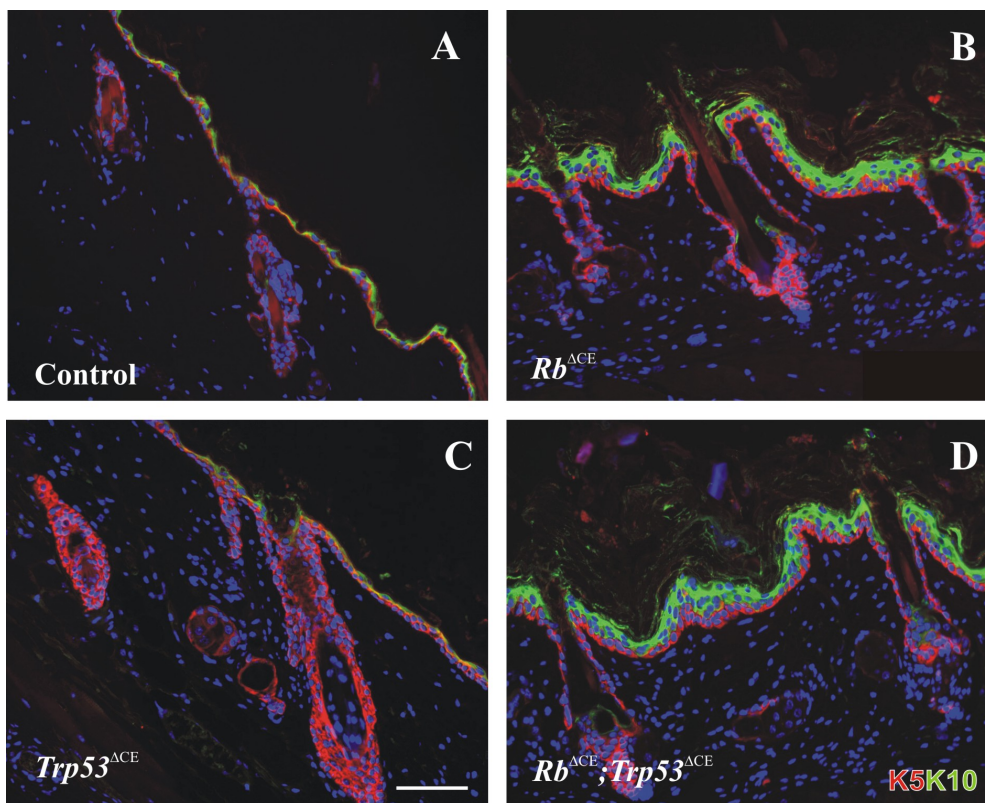


Figura 15. Caracterización de la diferenciación en epidermis deficiente en $Trp53$ y en Rb y $Trp53$. Doble inmunofluorescencia de marcadores de proliferación, K5 (rojo), y diferenciación temprana, K10 (verde), en epidermis de ratones adultos control (A), $Rb^{\Delta CE}$ (B), $Trp53^{\Delta CE}$ (C) y $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$ (D). La ausencia de Rb induce la expansión de K5 hacia capas suprabasales donde, esporádicamente, solapa su expresión con K10 (B). Estas alteraciones no se ven agravadas por la ausencia de $Trp53$ (D). Barra, 100 μ m. DAPI en azul.

1. 2. Proliferación en la epidermis deficiente en p53 y en pRb y p53

La hiperplasia y la hiperqueratosis de los animales $Rb^{\Delta CE}$ se asocian a alteraciones en la regulación de la proliferación tanto de las células basales, como de las suprabasales de la epidermis. Para analizar si en ausencia de pRb la deficiencia en p53 varía los niveles de proliferación, se estudió este proceso en la epidermis de animales de los distintos genotipos por medio del análisis de incorporación de BrdU. En ausencia de p53 la incorporación de BrdU en epidermis no varía respecto al control (fig. 16 A y C). Por el contrario, en la epidermis en ausencia de pRb, la incorporación de BrdU se ve incrementada en la capa basal con respecto a la de animales control (Fig. 16 B). Este incremento no se modifica con la pérdida de p53 (fig. 16 D). Además, en los animales $Trp53^{\Delta CE}$ y $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$ se observa un aumento de la incorporación de BrdU en células dispersas de la dermis (flechas en fig. 16 C y D) con respecto a lo observado en controles y en $Rb^{\Delta CE}$ (fig. 16 A y B). Estas células podrían corresponder a células inflamatorias o a células de vasos sanguíneos. Estos procesos se estudiarán con detalle más adelante.

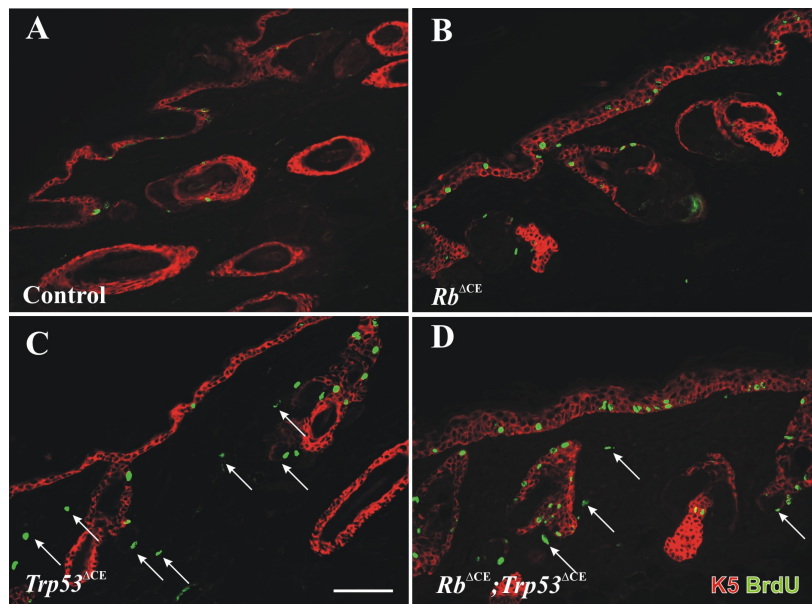


Figura 16. Proliferación en la epidermis deficiente en Trp53 y en Rb y Trp53. Doble inmunofluorescencia de K5 (rojo) y BrdU (verde) en epidermis de ratones adultos control (A), $Rb^{\Delta CE}$ (B), $Trp53^{\Delta CE}$ (C) y $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$ (D). La deficiencia en Rb provoca un aumento de proliferación en las capas basales de la epidermis (B). La pérdida de Trp53 en ausencia de Rb no provoca aumentos en la proliferación (D). Se produce un aumento de la incorporación de BrdU en dermis de animales $Trp53^{\Delta CE}$ (flechas C) y $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$ (flechas D). Barra, 100 μm .

2. Carcinomas escamosos inducidos por la inactivación somática de *Trp53* y de *Rb* y *Trp53*

2.1. Tumorigénesis espontánea en los ratones deficientes en p53 y en pRb y p53 en epidermis

Recordemos que los animales deficientes en pRb en epidermis no desarrollan tumores espontáneos (Ruiz y col, 2004), y que bajo tratamientos de carcinogénesis química, se originan menor número de papilomas y de menor tamaño que en los animales control (Ruiz y col., 2005). Esto se debe a que se produce una inducción de p53 lo que provoca un aumento de la apoptosis. Por otro lado, estos papilomas tienden a malignizar rápidamente debido a una presión selectiva que induce la pérdida prematura de p53 y su conversión a SCC (Ruiz y col., 2005). Según nuestros estudios, y a pesar de que la pérdida de p53 en epidermis no causa ningún fenotipo evidente en la piel, se observa que los animales *Trp53^{ACE}* desarrollan tumores espontáneos en un 100% de los casos (fig. 17 A). El comienzo de la aparición de estas lesiones está alrededor de 5 meses de edad, y la totalidad de los animales han desarrollado tumores a los 12 meses. La media de aparición de los tumores es de 8.3 ± 1.1 meses. Esta susceptibilidad tumoral se ve acelerada en los animales *Rb^{ACE};Trp53^{ACE}* (fig. 17 A), donde se observa que el comienzo de la aparición de las lesiones se produce a los 3 meses y la totalidad de los animales han desarrollado tumores a los 8 meses de edad, con una media de aparición tumoral de 5.5 ± 1.4 meses; ($p \leq 0.0009$). La multiplicidad o número de tumores por animal está incrementada en el caso de los animales doble deficientes en comparación con los *Trp53^{ACE}* (3.4 ± 0.7 frente a 1.1 ± 0.8 respectivamente; $p \leq 0.0006$).

Los resultados anteriores indican que p53 es un supresor tumoral esencial en la epidermis ya que la ausencia de p53 es la que determina la aparición de tumores. El hecho de que la doble deficiencia en pRb y p53 acelere la aparición tumoral, puede indicar la existencia de una cooperación funcional entre pRb y p53 en su función supresora de tumores en epidermis. Para analizar esta posible cooperación se realizó un

completo estudio del desarrollo tumoral en un amplio número de animales con las diferentes combinaciones alélicas en *Trp53* y en *Rb*.

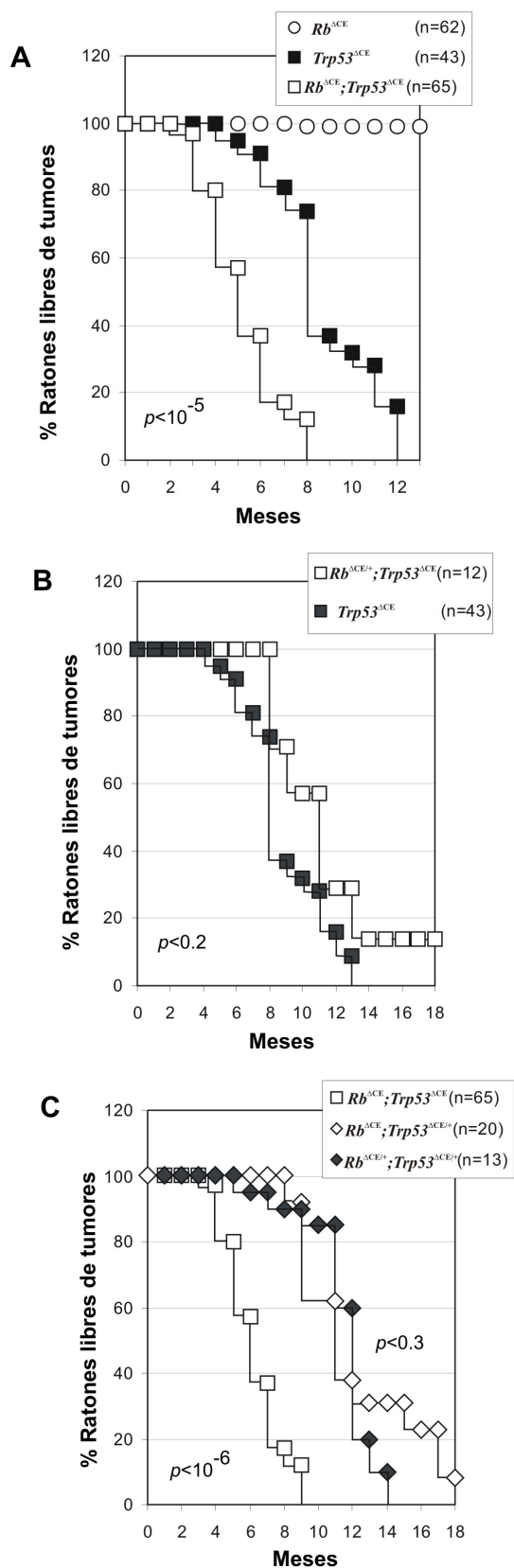


Figura 17. Tumorigénesis espontánea en ratones deficientes en *Trp53* y *Rb* y *Trp53* en epidermis. Distribución de Kaplan–Meier de los ratones libres de tumores en función de la edad. A) Comparación de los ratones *Rb*^{ΔCE} (n=62), *Trp53*^{ΔCE} (n=43) y *Rb*^{ΔCE};*Trp53*^{ΔCE} (n=65). B) Comparación de los ratones *Rb*^{ΔCE/+};*Trp53*^{ΔCE} (n=12) y *Trp53*^{ΔCE} (n=43). C) Comparación de los ratones *Rb*^{ΔCE};*Trp53*^{ΔCE} (n=65), *Rb*^{ΔCE};*Trp53*^{ΔCE/+} (n=20) y *Rb*^{ΔCE/+};*Trp53*^{ΔCE/+} (n=13). n, número de animales analizados de cada genotipo. P, valor p de significancia de cada par de muestras representadas.

En estos estudios se observa que la heterocigosidad de *Rb* no acelera el desarrollo tumorigénico en ausencia de *Trp53* (fig. 17 B). Una sólo copia del gen *Rb* es suficiente por tanto para evitar el aumento de susceptibilidad tumorigénica en ausencia de *Trp53*. Por otro lado, la heterocigosidad de *Trp53* en animales deficientes en *Rb* en epidermis, conduce al desarrollo tumoral, aunque este se produce más retrasado comparado con el que se produce con la pérdida completa de *Trp53* (fig. 17 C). Según estos datos la susceptibilidad tumoral que se atribuye a la pérdida de *Trp53*, sólo se ve acelerada por la completa pérdida de *Rb*.

2. 2. Posibles efectos provocados por la ausencia de p53 en la epidermis de los animales *Trp53*^{ΔCE}

Como se comentó anteriormente, la ausencia de p53 específica en epidermis conduce a la aparición de tumores epiteliales espontáneos. Los mecanismos por los que se produce el desarrollo tumoral se desconocen por el momento. Para intentar determinar cuáles son los procesos que conducen al desarrollo tumoral en epidermis, nos centraremos en el estudio de tres de las actividades de p53 cuya alteración pueda estar implicada en carcinogénesis. En primer lugar, p53 interviene en el proceso de catagén durante la progresión del ciclo del pelo (Botchkarev y col., 2001; Botchkarev y Paus, 2003). En segundo lugar, p53 inhibe la respuesta inflamatoria mediada por NFκB (Komarova y col., 2005; Tergaonkar y Perkins, 2007). Por último, p53 previene la amplificación alterada de centrosomas en el proceso mitótico y por tanto la formación de mitosis aberrantes (Carroll y col., 1999; Caulin y col., 2007; Fukasawa y col., 1996; Meek, 2000). A continuación se describen los resultados obtenidos en las distintas aproximaciones experimentales destinadas para el estudio de estos procesos.

2. 2. 1. Alteraciones en el ciclo del pelo

En ausencia de desencadenantes externos, una de las situaciones fisiológicas de la piel en la que es importante el proceso de apoptosis mediada por p53, es la fase de catagén del ciclo del pelo (fase degenerativa), siendo un mecanismo clave para que se produzca la regresión del pelo anagénico (fase proliferativa) (Botchkarev y col., 2001;

Lindner y col., 1997). La deficiencia de p53 en la epidermis de los animales *Trp53^{ΔCE}* podría provocar alteraciones en el desarrollo normal del ciclo del pelo, retrasos en la regresión del folículo, remanentes de folículos en anagén u otras alteraciones que podrían conducir a la formación de displasias foliculares y lesiones que den lugar al desarrollo del tumor. Para estudiar estos fenómenos, se sometió a animales *Trp53^{ΔCE}* (n = 10) y a animales control (n = 5) a dos depilaciones sucesivas. La depilación sirve como estímulo para provocar una entrada sincronizada en anagén (Stenn y Paus, 2001). Para analizar si se producen alteraciones en el ciclo del pelo se recogieron para histología muestras de epidermis a los 22 días después de la última depilación, tiempo necesario para el paso de anagén a telogén. No se detectaron alteraciones apreciables en los folículos pilosos de epidermis depiladas de los animales *Trp53^{ΔCE}* con respecto a las de animales control. Tampoco se detectó crecimiento tumoral en la zona depilada de animales *Trp53^{ΔCE}* (n = 5) respecto a animales control depilados (n = 3) o *Trp53^{ΔCE}* sin depilar, 5 meses después de la última depilación (conviene señalar que la zona depilada de lomo no es la zona normal de aparición de tumores espontáneos tal y como se comenta más adelante). Estos estudios indican que no se produce un aumento en la incidencia de aparición de lesiones pretumorales de origen folicular en los animales *Trp53^{ΔCE}* tras estímulos depilativos. Esto podría ser una evidencia de que las posibles alteraciones en el ciclo del pelo que se producen en ausencia de p53 en epidermis no son un mecanismo esencial del desarrollo tumoral en los animales.

2. 2. 2. Procesos inflamatorios en la epidermis y en los tumores

p53 interviene en la represión de la respuesta inflamatoria inhibiendo la transcripción dependiente de la vía de NFκB (Komarova y col., 2005; Tergaonkar y Perkins, 2007). Por tanto, la ausencia de p53 en la epidermis de los animales de estudio, podría provocar un aumento de los procesos inflamatorios que favoreciera la tumorigénesis. Para comprobar este aspecto se realizaron distintas aproximaciones experimentales para el estudio de la presencia de células inflamatorias, análisis bioquímicos y análisis de la expresión génica.

Mediante dobles inmunofluorescencias se analizó la presencia de células inflamatorias en pieles no lesionadas de animales sin desarrollo tumoral aparente y en

tumores, empleando diferentes marcadores específicos. Concretamente se emplearon CD45, Mac1 y Gr1 como marcadores propios de leucocitos, macrófagos y granulocitos respectivamente (Fleming y col., 1993; Springer y col., 1979; Yakura y col., 1989). Se observó un aumento de estos tipos celulares en pieles sin lesión de animales adultos $Trp53^{\Delta CE}$ y $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$ (fig. 18) con respecto al que se produce en pieles de animales control, aunque no se observaron cambios reseñables entre los dos genotipos. De forma significativa, no se detectó un mayor aumento de la presencia de estas células en los tumores espontáneos (fig. 18), lo que podría ser una evidencia de que se produce un proceso proinflamatorio previo al desarrollo tumoral y que los niveles de células inflamatorias se mantienen durante el proceso carcinogénico.

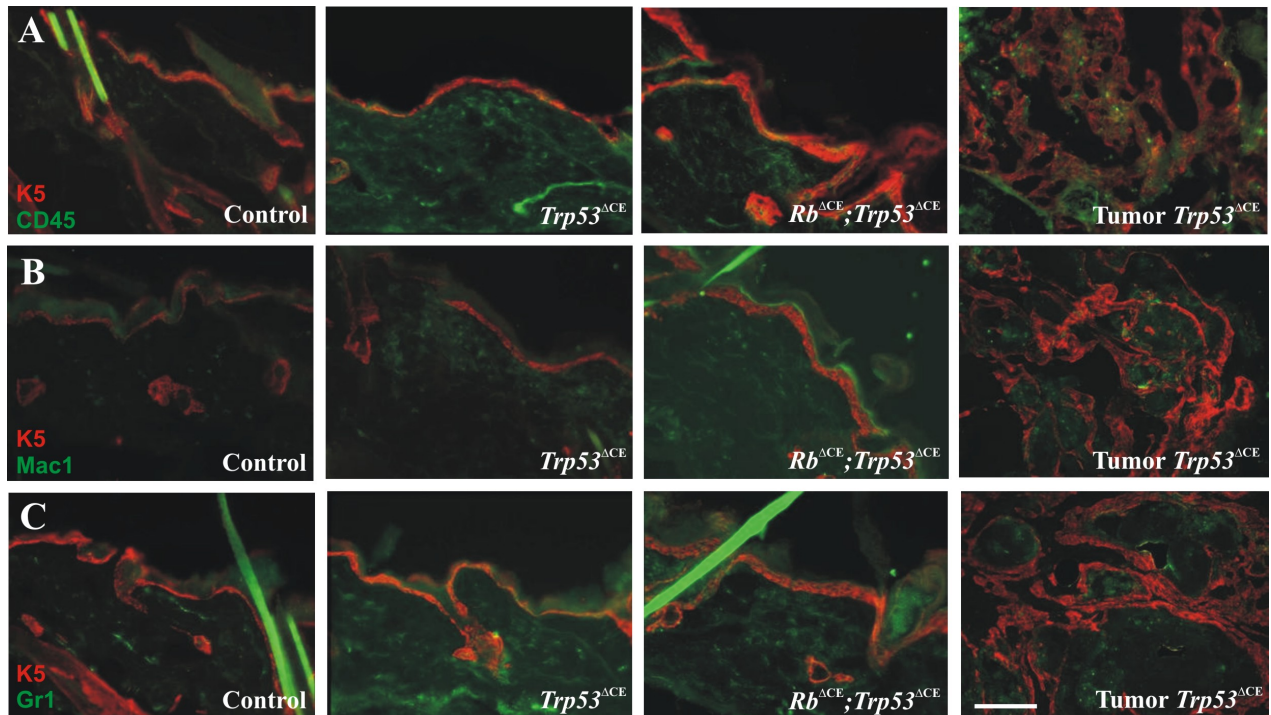


Figura 18. Detección de leucocitos, macrófagos y granulocitos en pieles y tumores de los distintos genotipos de estudio. Doble inmunofluorescencia de K5 (rojo) y CD45 como marcador de leucocitos (verde, A), Mac-1 como marcador de macrófagos (verde, B) y Gr-1 como marcador de granulocitos (verde, C) en criocortes de pieles de animales control, $Trp53^{\Delta CE}$ y $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$ y en tumores. Se produce un aumento en la expresión de estos marcadores en las pieles $Trp53^{\Delta CE}$ y $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$ con respecto a la piel control. En tumores no se produce un mayor aumento de esta expresión. Barra, 150 μ m.

La implicación de la señalización mediada por la familia NFκB en la inflamación está bien estudiada (Li y Verma, 2002). Además, esta vía se ha demostrado como uno de los mecanismos más relevantes en diferentes procesos fisiológicos y patológicos en epidermis (Mantovani y col., 2008). En consecuencia, con el fin de determinar posibles alteraciones en inflamación asociadas a esta vía de señalización, se realizaron análisis bioquímicos por western blot a partir de extractos proteínicos de pieles sin lesión de animales de los distintos genotipos. Los datos demuestran, de acuerdo con los datos previos, un ligero aumento de la señalización de la vía clásica de NFκB en los genotipos deficientes en p53 (fig. 19), no encontrándose diferencias entre la piel de animales deficientes en p53 con la de los doble deficientes.

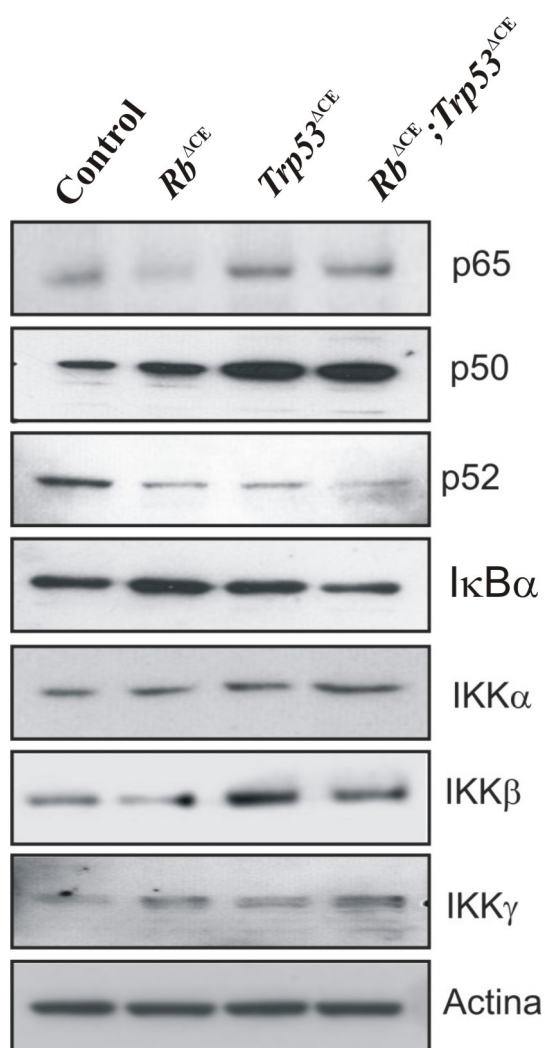


Figura 19. Aumento de la señalización de la vía de NFκB en las pieles sin lesión de animales deficientes en *Trp53* y en *Rb* y *Trp53* en epidermis. Análisis bioquímico a partir de extractos de pieles sin lesión de ratones adultos control, $Rb^{\Delta CE}$, $Trp53^{\Delta CE}$ y $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$ para el estudio de la expresión de proteínas implicadas en la vía de NFκB. Se observa un aumento de las proteínas activadoras de la vía (p65, p50 e IKK β) y disminución de las represoras (p52 e $I\kappa B\alpha$) sin encontrar diferencias entre $Trp53^{\Delta CE}$ y $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$. La actina fue usada como control de carga.

Estos datos sugieren que la ausencia de p53 confiere susceptibilidad al desarrollo tumoral a través de procesos relacionados con la inflamación, lo que podría explicar las alteraciones histológicas observadas en las pieles y los datos del incremento de proliferación en dermis en los animales *Trp53^{ΔCE}* y *Rb^{ΔCE};Trp53^{ΔCE}* comentados anteriormente.

A pesar de esto, y debido a que los animales utilizados en los estudios anteriores son adultos y han podido desarrollar microtumores no detectables visualmente, decidimos realizar un estudio génico a partir de pieles de recién nacido con el fin de determinar si el aumento en los procesos inflamatorios se produce previo a la aparición de tumores o como consecuencia del propio proceso carcinogénico en zonas adyacentes o relativamente alejadas. En este sentido se ha descrito por ejemplo, que animales con tumores presentan elevadas concentraciones de citoquinas en sangre que pueden contribuir al crecimiento tumoral (Bauluz y col., 1994).

Mediante análisis de expresión génica a partir de pieles de recién nacido, y usando análisis de ANOVA ($p < 0.01$) entre los distintos genotipos de estudio, se seleccionaron 1435 genes expresados diferencialmente. Entre ellos destacan genes implicados en inflamación pertenecientes a la familia de las interleuquinas, marcadores de superficie de células inmunes, quimioquinas, receptores de señales inflamatorias, etc (fig. 20. Anexo, tabla A1).

A pesar de que se produce desregulación de un mayor número genes en los animales *Rb^{ΔCE};Trp53^{ΔCE}*, los datos globales parecen confirmar que tiene lugar una respuesta proinflamatoria en las pieles deficientes en p53 antes del desarrollo tumoral. Esta respuesta se produce tanto en los animales *Trp53^{ΔCE}* como en los *Rb^{ΔCE};Trp53^{ΔCE}*, lo que sugiere que los procesos inflamatorios no son responsables de la aceleración del desarrollo tumoral en los animales doble deficientes, aunque pueden estar implicados en la génesis de los tumores de ambos modelos.

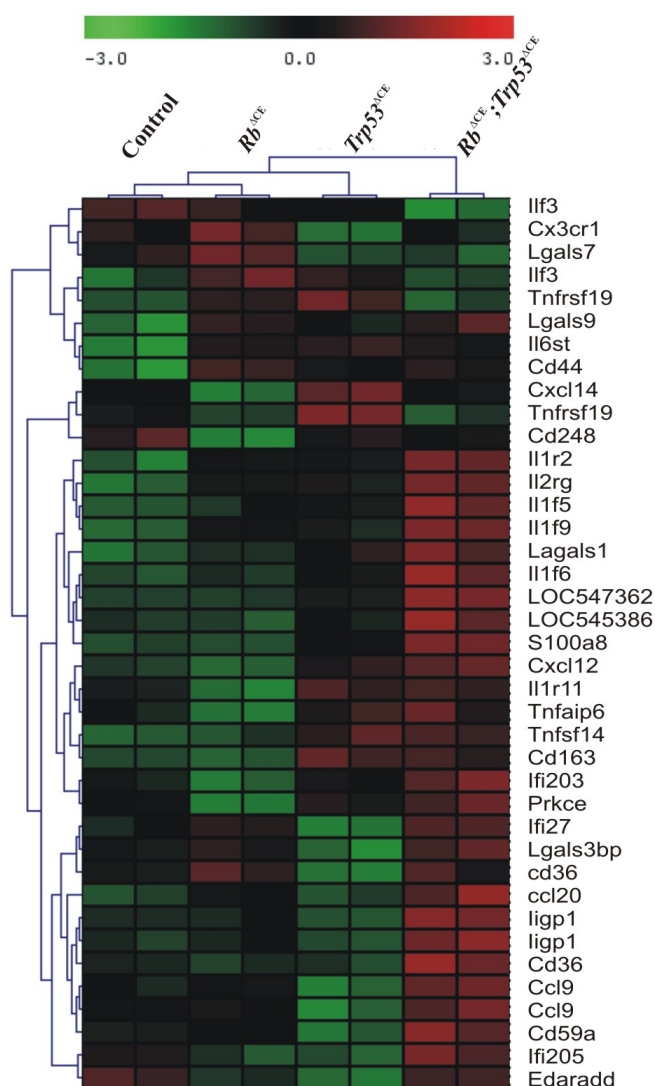


Figura 20. Genes implicados en inflamación diferencialmente expresados en los distintos genotipos de estudio. Representación de la expresión relativa de genes implicados en inflamación, tras análisis de biochips a partir de piel de recién nacido de ratones control, $Rb^{\Delta CE}$, $Trp53^{\Delta CE}$ y $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$. Los genes seleccionados por análisis de ANOVA ($p < 0.01$) incluyen, entre otros, a interleuquinas, citoquinas, marcadores de superficie y receptores de señales inflamatorias (Anexo, tabla A1).

2. 2. 3. Mitosis aberrantes y amplificación centrosómica en epidermis y tumores

La implicación de p53 en prevenir alteraciones en la amplificación de los centrosomas y evitar así mitosis aberrantes ha sido estudiada en profundidad. Se ha descrito que en ausencia de p53 se producen alteraciones en la amplificación centrosómica que conducen a una desigual segregación de los cromosomas causando así inestabilidad cromosómica (Carroll y col., 1999; Caulin y col., 2007; Fukasawa y col., 1996; Meek, 2000).

Podemos pensar, por tanto, que si se producen mitosis aberrantes provocadas por la ausencia de p53, éstas puedan inducir el desarrollo de tumores espontáneos. Por este motivo, nos propusimos analizar y cuantificar las mitosis aberrantes en la epidermis y en los tumores desarrollados en nuestros modelos deficientes en p53. En la epidermis de animales $Trp53^{\Delta CE}$ y $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$ se produce un aumento significativo del porcentaje de mitosis aberrantes con respecto al que existe en la epidermis de animales control y $Rb^{\Delta CE}$ (fig. 21 A, B y E). En el caso de los tumores aumenta el porcentaje de mitosis aberrantes con respecto al de epidermis, sin encontrarse diferencias entre los tumores de animales $Trp53^{\Delta CE}$ y $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$ (fig. 21 C, D y E). Este aumento de alteraciones mitóticas en la epidermis deficiente en p53, sugiere que dichas alteraciones podrían estar implicadas en el desarrollo tumoral en los animales.

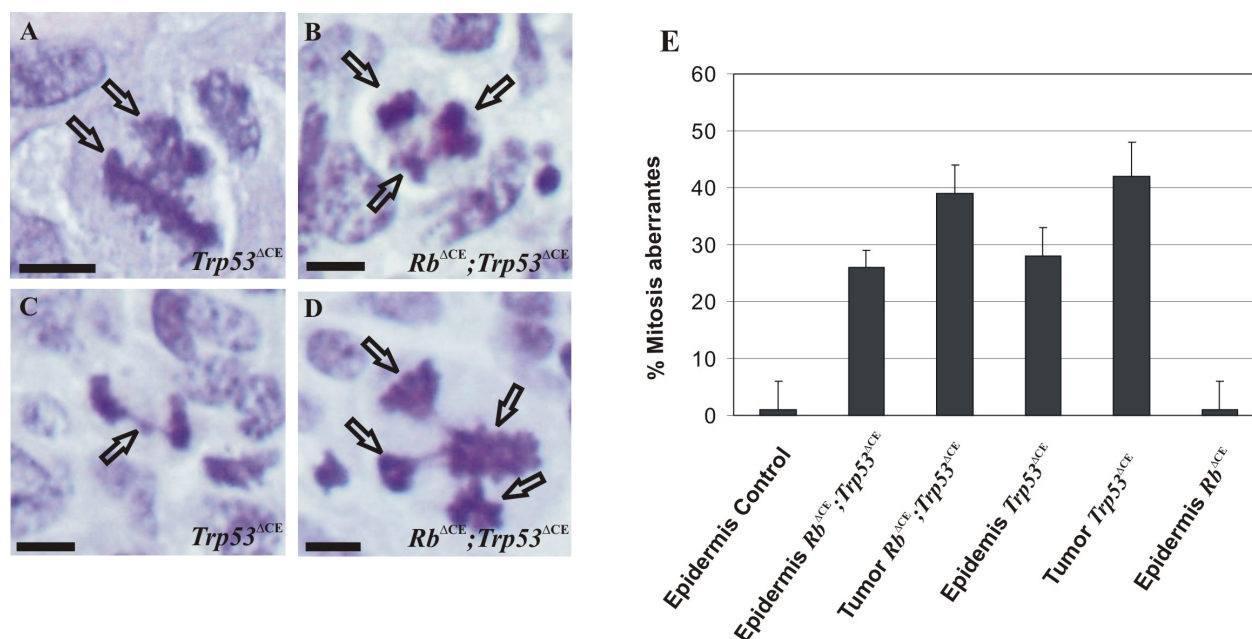


Figura 21. Presencia de mitosis aberrantes en epidermis y tumores de ratones $Trp53^{\Delta CE}$ y $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$. Detección de la presencia de mitosis aberrantes por alteraciones en la segregación cromosómica a partir de la visualización de tinciones de hematoxilina-eosina en epidermis de animales $Trp53^{\Delta CE}$ (A) y $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$ (B) y en tumores $Trp53^{\Delta CE}$ (C) y $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$ (D). Barra, 10 μm . E) Cuantificación del porcentaje de mitosis aberrantes en epidermis de animales control, $Rb^{\Delta CE}$, $Trp53^{\Delta CE}$ y $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$ y en tumores $Trp53^{\Delta CE}$ y $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$ (3 a 7 secciones en 5 muestras de epidermis o tumor diferentes). Se produce un aumento en el porcentaje de mitosis aberrantes en epidermis deficientes en p53 con respecto a la epidermis control y $Rb^{\Delta CE}$. El porcentaje aumenta aún más en los tumores.

Se produce un aumento en el número de mitosis en folículos pilosos con respecto a zonas de epidermis interfolicular en los distintos modelos de estudio (fig. 22 A). Concretamente, en los animales Rb^{ACE} y $Rb^{ACE};Trp53^{ACE}$ se produce un drástico aumento del número de mitosis en los folículos (fig. 22 A), en consonancia al aumento de proliferación observado en esta localización y que se estudiará en profundidad en resultados posteriores (apartado 2. 5.). La pérdida de p53 en ausencia de pRb incrementa, por tanto, el número de mitosis aberrantes en folículos pilosos, lo que podría explicar la aceleración en el desarrollo tumoral que se produce en los animales $Rb^{ACE};Trp53^{ACE}$.

El aumento del porcentaje de mitosis aberrantes en la epidermis $Trp53^{ACE}$ y $Rb^{ACE};Trp53^{ACE}$ podría ser uno de los desencadenantes de la posterior inducción del desarrollo tumoral en estos animales.

Para reforzar estos estudios se cuantificó el porcentaje de mitosis aberrantes en papilomas, papilomas con signos de malignización y SCCs desarrollados tras protocolos de carcinogénesis química en animales Rb^{ACE} . Recordemos que estos animales desarrollan menos papilomas que los animales control, pero que estos tumores malignizan en mayor grado debido a que se produce una pérdida selectiva y prematura de p53 (Ruiz y col., 2005). Los papilomas Rb^{ACE} con signos de malignidad, que ya han sufrido la pérdida de p53, presentan un incremento de mitosis aberrantes similar al que se produce en los SCCs Rb^{ACE} , y excede significativamente al porcentaje que se produce en papilomas y SCCs desarrollados tras carcinogénesis química en animales control (fig. 22 B). De esta forma se observa que la pérdida de p53, responsable de la malignización tumoral bajo protocolos de carcinogénesis química, se asocia a mitosis aberrantes, lo que refuerza el hecho de que p53 controla el desarrollo tumoral en parte a través del mantenimiento mitótico.

Como se ha comentado anteriormente, la ausencia de p53 conduce a una amplificación inadecuada de los centrosomas, formándose en ocasiones más de dos (Fukasawa y col., 1996). Se analizaron por tanto este tipo de alteraciones cuantificando el número de centrosomas en la epidermis y en los tumores de nuestros animales $Trp53^{ACE}$.

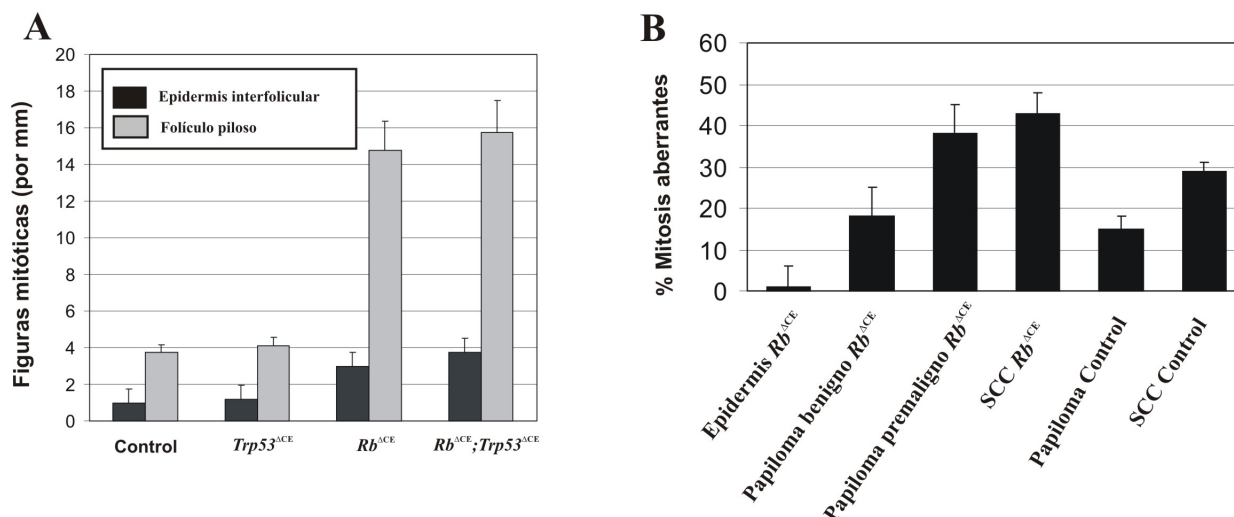


Figura 22. Cuantificación del número de mitosis en epidermis interfollicular y folículo piloso y de mitosis aberrantes en los distintos estados de progresión tumoral bajo protocolos de carcinogénesis química. A) Número de figuras mitóticas en epidermis interfollicular y en folículo piloso de animales control, Rb^{ΔCE}, Trp53^{ΔCE} y Rb^{ΔCE};Trp53^{ΔCE}. Presencia de un mayor número de mitosis en folículos pilosos de animales Rb^{ΔCE} y Rb^{ΔCE};Trp53^{ΔCE} debido al aumento de la proliferación inducida por la pérdida de Rb. B) Cuantificación del porcentaje de mitosis aberrantes en epidermis Rb^{ΔCE} y en papilomas y SCCs desarrollados en animales control y Rb^{ΔCE} tras protocolos de carcinogénesis química. El aumento de las mitosis aberrantes que se observa en papilomas y SCCs tras protocolos de carcinogénesis química en animales Rb^{ΔCE} se debe a la pérdida de p53.

Algunas de las imágenes de mitosis aberrantes nos dan una idea de la presencia de más de dos focos de segregación cromosómica, lo que indica la presencia de más de dos centrosomas (fig. 21 B y D). Mediante la visualización de la tubulina γ como marcador de centrómeros (Setoguchi y col., 2001), se comprobó que en ocasiones aparecen más de dos centrosomas en las mitosis de epidermis y tumores deficientes en p53 con respecto a las pieles control (fig. 23 A, epidermis control, A', epidermis Trp53^{ΔCE} y B, tumor Trp53^{ΔCE}). La mayoría de las mitosis en epidermis Trp53^{ΔCE} poseen un número normal de centrosomas, mientras que por el contrario, los tumores, con respecto a la epidermis, presentan mayor porcentaje de mitosis con un número alterado de centrosomas (fig. 23 C). Estas alteraciones en el número de centrosomas comienzan a producirse en la epidermis.

La alteración en el número de centrosomas está asociada a incrementos en la activación de los puntos de control mitótico. Un indicio de esta activación es el

aumento de la actividad de Chk1 y Chk2, proteínas responsables de la regulación del ciclo celular en casos en que la integridad del ADN está dañada (Bartek y Lukas, 2003). Por inmunofluorescencia se comprobó que hay un aumento de expresión de las formas fosforiladas de Chk1 y Chk2 (fig. 23 D y D'). Además, mediante estudios genómicos realizados en nuestro laboratorio, se observó que se produce un aumento en la expresión de genes implicados en el control mitótico en los tumores deficientes en p53 (véase en resultados más adelante). Estos datos nos hacen pensar que el desarrollo espontáneo de tumores en ausencia de p53 puede deberse a una aparición prematura de mitosis aberrantes debido a una falta de regulación normal de los puntos de control mitótico, y a una amplificación alterada de los centrosomas.

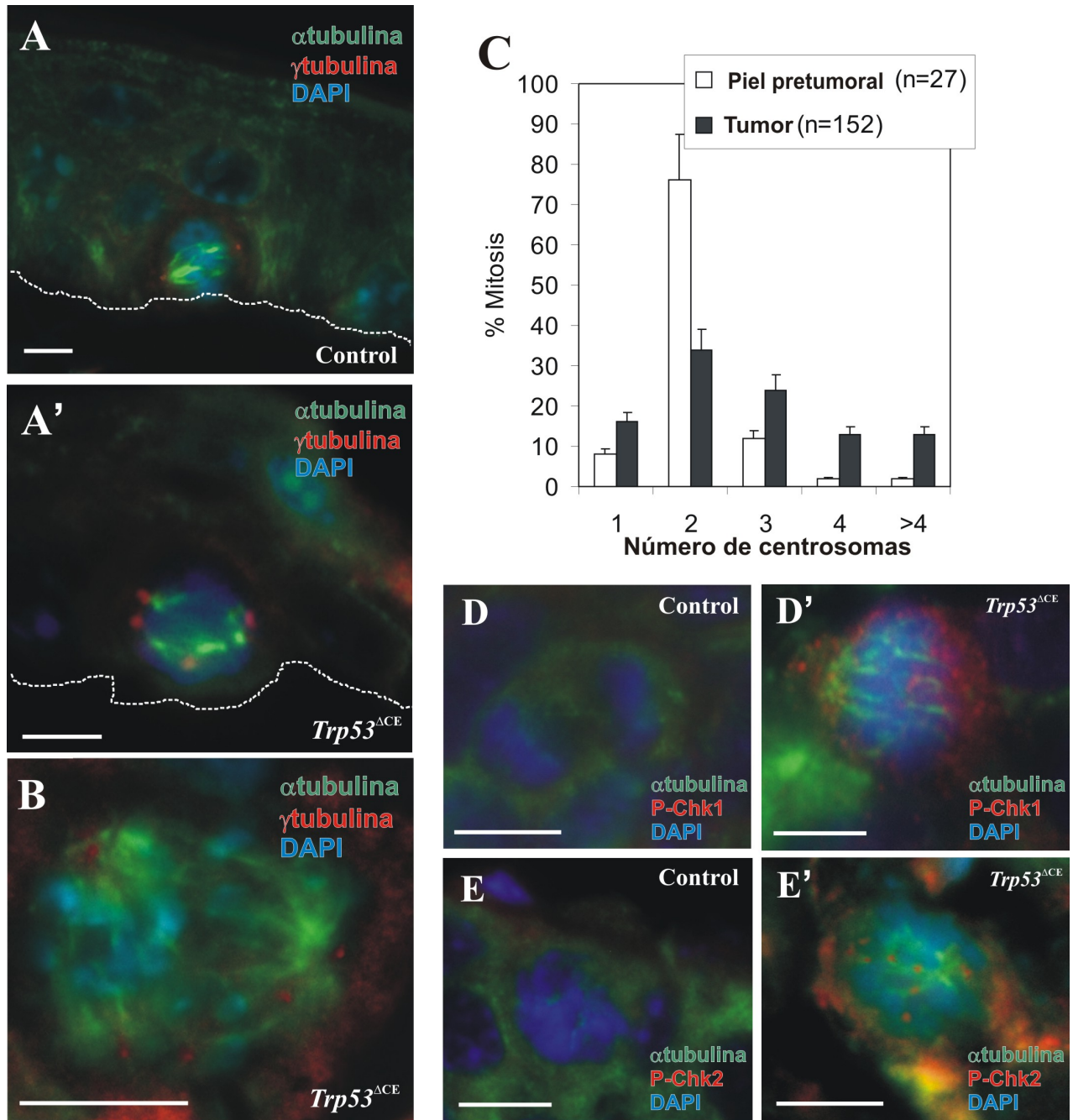


Figura 23. Amplificación centrosómica y aumento de la expresión de proteínas del punto de control mitótico en epidermis y tumores de ratones $Trp53^{ACE}$ y $Rb^{ACE};Trp53^{ACE}$. Visualización de centrosomas mitóticos en epidermis de animales control (A) y $Trp53^{ACE}$ (A') y en tumores $Trp53^{ACE}$ (B) mediante la detección de γ -tubulina (rojo) en doble inmunofluorescencia con α -tubulina (verde). C) Cuantificación del porcentaje de mitosis con distinto número de centrosomas en pieles sin lesión y en tumores. Se produce una mayor amplificación en el número de centrosomas en tumores respecto a epidermis (n = número de mitosis). Detección de la expresión de proteínas responsables del control mitótico (P-Chk1, rojo, D y D' y P-Chk2, rojo, E y E') en doble inmunofluorescencia con α -tubulina (verde). Barra, 10 μ m.

2. 3. Desarrollo, caracterización y origen folicular de los tumores

El tipo y la localización de los tumores son similares en los animales $Trp53^{\Delta EC}$ y en los $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$. Los tumores se desarrollan casi exclusivamente en distintas áreas de la piel como son el cuello, el hocico, zona perianal, palpebral, lóbulo de la oreja y piel de la zona de los flancos, y en la mayoría de los casos aparecen de forma subcutánea a diferencia de lo que ocurre en el caso de tumores originados tras protocolos de carcinogénesis química en otros modelos.

Los análisis histológicos revelan que la mayor parte de los tumores desarrollados son carcinomas epidérmicos de tipo carcinoma escamoso. Concretamente se desarrolla un 92.2% de SCCs de un total de 212 tumores analizados. El resto de los tumores presentan un aspecto adenomatoso lo que sugiere un posible origen glandular. En su mayoría son SCCs poco diferenciados (fig. 24 A), caracterizados por una alta expresión de la queratina basal K5 (fig. 24 B) y pérdida o reducción de las queratinas suprabasales K10, K6 y K17 (fig. 24 B, C y D).

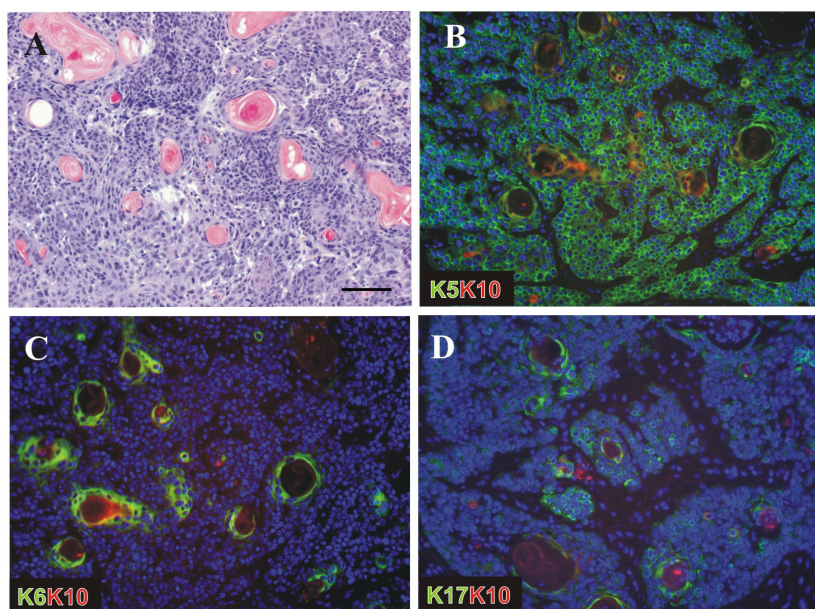


Figura 24. Caracterización de los SCCs desarrollados en los animales $Trp53^{\Delta EC}$ y $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$. A) Hematoxilina-eosina de un SCC poco diferenciado de un animal $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$. Doble inmunofluorescencia con distintos marcadores de diferenciación. Se observa una alta expresión de K5 (verde, B) y una progresiva reducción en K10 (rojo, B, C y D), K6 (verde, C) y K17 (verde, D). Barra, 100 μm .

Estos carcinomas tienden a evolucionar a tumores con células de morfología fusiforme muy agresivos e invasivos, carcinomas de células fusiformes, que llegan a perder por completo la expresión de los marcadores epiteliales como se discutirá más adelante.

El estudio de la epidermis de los animales $Trp53^{\Delta CE}$ y $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$ desvela la presencia de múltiples folículos displásicos de los que surgen masas de células tumorales en sus extremos (fig. 25 A). En estos estados tempranos de tumorigénesis se observa la expresión de marcadores específicos de folículo piloso como son K15 y K17 junto con la expresión de K5 (fig. 25 B y C), lo que confirma el origen folicular de los tumores. Estos datos están en consonancia con las evidencias anteriores de que el desarrollo tumoral podía desencadenarse a partir de un aumento de mitosis aberrantes en folículos pilosos de animales $Trp53^{\Delta CE}$ y $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$.

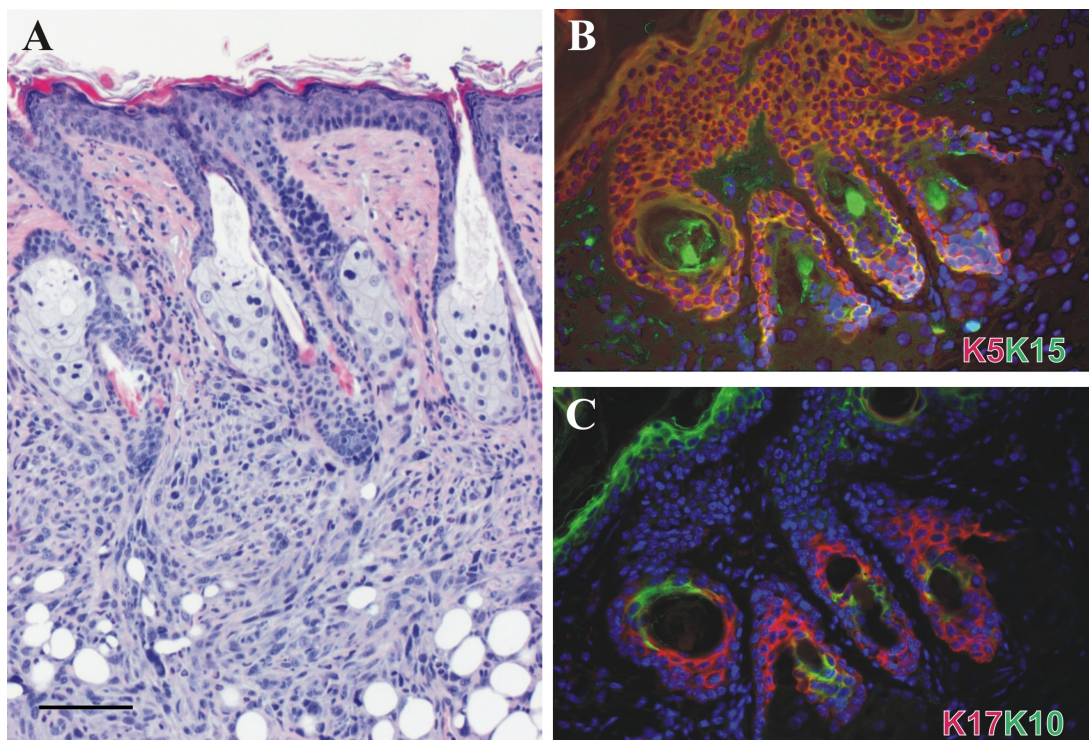


Figura 25. Origen folicular de los tumores. A) Hematoxilina-eosina de una sección de epidermis $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$ donde se observan masas de células tumorales que crecen a partir de folículos pilosos displásicos. B y C) Detección de los marcadores foliculares K15 (verde, B) y K17 (rojo, C) en doble inmunofluorescencia con K5 (rojo, B) y K10 (verde, C) en lesiones premalignas $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$. Barra, 100 μ m.

Como se verá con detalle más adelante (apartado 2. 5), en los folículos pilosos de los modelos de estudio se produce un incremento de la tasa de proliferación, lo que conlleva una mayor probabilidad de que se produzcan mitosis aberrantes. De esta forma, se propicia la aparición de la lesión en el folículo y el posterior desarrollo tumoral. Además, la presencia de K15 indica la existencia en el tumor de células madre foliculares, lo que está en consonancia con el enriquecimiento en marcadores genómicos propios de células madre humanas observados en los tumores analizados tras análisis de biochips (ver resultados más adelante).

La incidencia de aparición de displasias en folículos pilosos es mayor en los animales $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$ (41.6%; n = 36) con respecto a los animales $Trp53^{\Delta CE}$ (23.5%; n = 17). Esto podría explicar el mayor número de lesiones que se produce en los animales doble deficientes con respecto a los deficientes en p53 y está en concordancia con el aumento de mitosis aberrantes en los folículos de animales $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$.

2. 4. Análisis de apoptosis en estados tempranos y avanzados de los tumores

De acuerdo con el papel de p53 como modulador de apoptosis, es de esperar que el grado de apoptosis en la epidermis de los modelos animales deficientes en p53 sea bajo en todos los casos. Además, se ha demostrado que hay una ausencia de apoptosis en piel interfolicular en ausencia de tratamientos carcinogénicos (Segrelles y col., 2007), mientras que se produce un aumento de apoptosis en epidermis $Rb^{\Delta CE}$ bajo protocolos de carcinogénesis química (Ruiz y col., 2005). Mediante estudios de muerte celular utilizando técnicas de TUNEL, se analizó la presencia de células apoptóticas en la epidermis de los animales $Trp53^{\Delta CE}$ y $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$ observando en general una ausencia de apoptosis (fig. 26 A y A').

Al igual que sucede en epidermis, el grado de apoptosis en los distintos estados tumorales es muy bajo tanto en los animales $Trp53^{\Delta CE}$ como en los $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$. Analizamos la presencia de células apoptóticas en lesiones tumorales tempranas y avanzadas de los animales $Trp53^{\Delta CE}$ y $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$ (fig. 26 B, B', C y C'). Además de los bajos niveles esperados, no se encuentran diferencias significativas en la apoptosis

observada en epidermis, folículos normales, folículos displásicos y en tumores entre los animales $Trp53^{\Delta CE}$ y $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$. Por lo tanto podemos afirmar que la temprana incidencia de aparición de los tumores en los animales doble deficientes no se debe a niveles alterados de apoptosis en folículos pilosos.

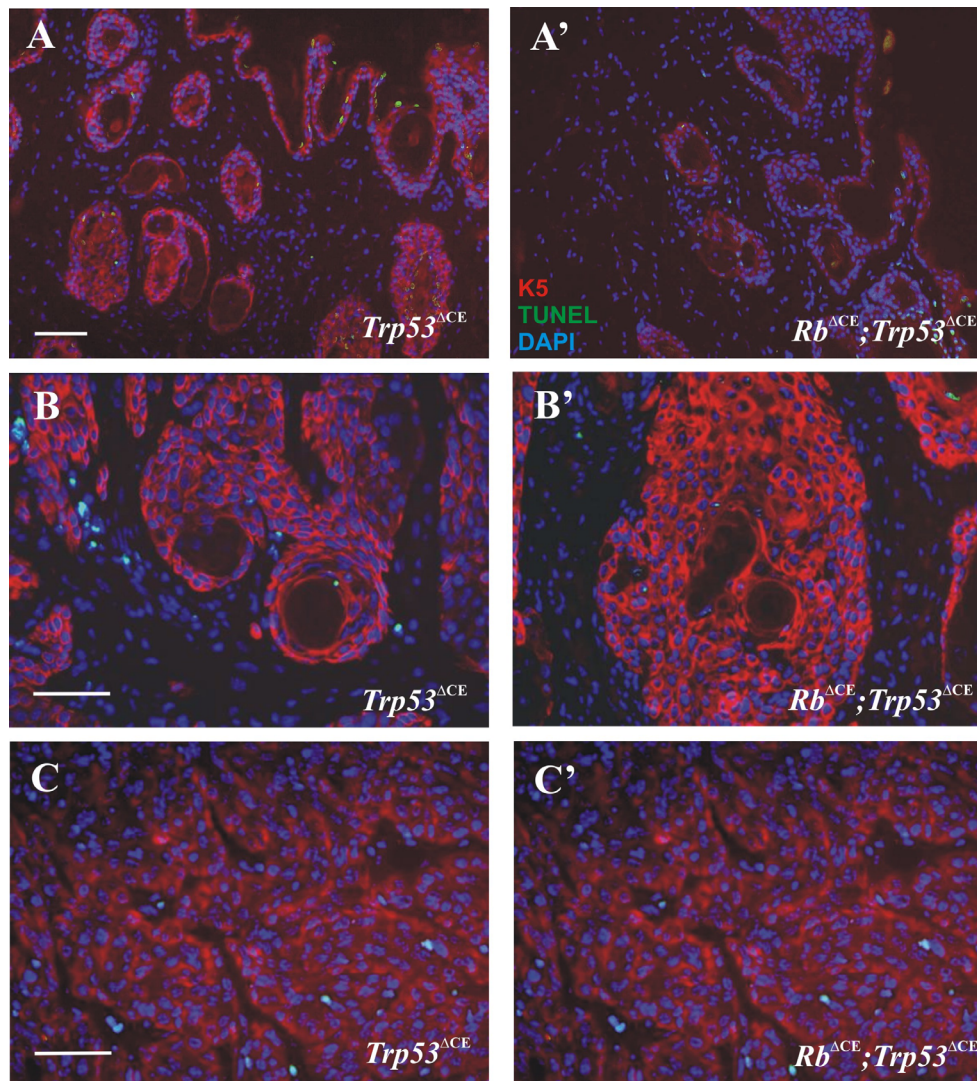


Figura 26. Detección de células apoptóticas en epidermis y tumores de ratones $Trp53^{\Delta CE}$ y $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$. Doble inmunofluorescencia para la detección de K5 (rojo) y apoptosis (mediante la técnica de TUNEL, verde) en epidermis sin lesión (A y A'), en folículos displásicos (B y B') y en tumores avanzados (C y C') de animales $Trp53^{\Delta CE}$ (A, B y C) y $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$ (A', B' y C'). Se observa en general una ausencia de apoptosis. Barra, 150 μ m.

2. 5. Estudios de proliferación en folículos displásicos y en estados tempranos y avanzados de los tumores

En animales $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$ se produce un incremento significativo de la proliferación en folículos sin lesión respecto a zonas interfoliculares, observado mediante análisis de incorporación de BrdU. Este incremento es similar al que se produce tanto en folículos alterados o displásicos (fig. 27 A' y D), como en estados tempranos y/o avanzados los tumores (fig. 27 B', C' y D). Por el contrario, en los animales $Trp53^{\Delta CE}$ el aumento de proliferación en folículos es más moderado y progresivo llegando a alcanzar sólo en tumores avanzados los niveles de proliferación que presentan los animales doble deficientes (fig. 27 A, B, C y D).

No se detectan por tanto diferencias en la proliferación entre tumores indiferenciados desarrollados en animales $Trp53^{\Delta CE}$ y $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$. Esto podría deberse a que, los tumores de animales $Trp53^{\Delta CE}$, sufran en sus últimas etapas una inactivación funcional de miembros de la vía de pRb. A pesar de esto, el incremento en la incidencia y en la temprana aparición de tumores en el caso de los animales $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$ se puede atribuir al aumento observado en la proliferación en folículos pilosos, lo que conduce a la formación temprana de displasias y a la aceleración en la progresión tumoral con respecto a los animales $Trp53^{\Delta CE}$.

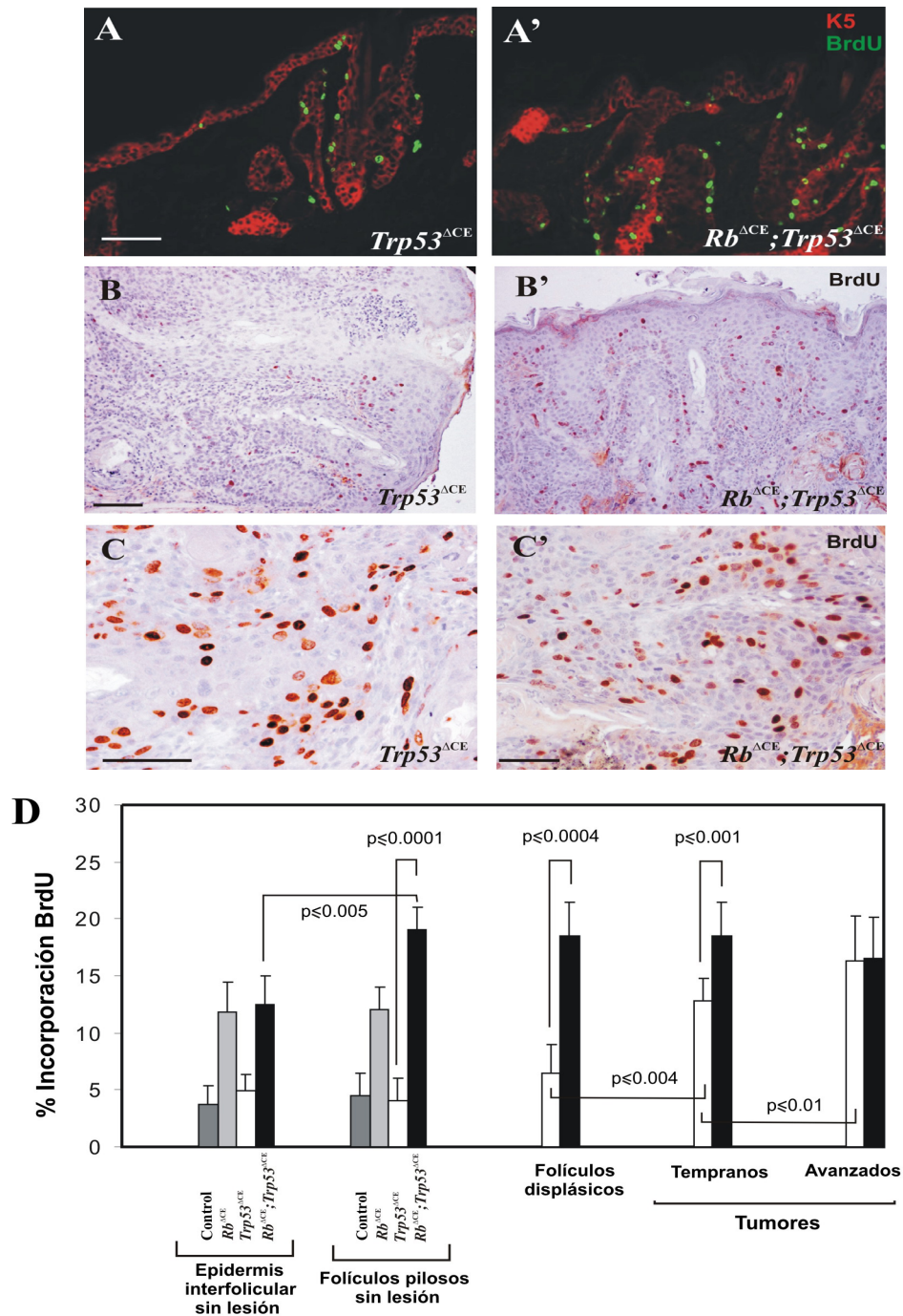


Figura 27. Estudios de proliferación en lesiones tempranas y tumores de ratones $Trp53^{\Delta CE}$ y $Rb^{\Delta CE}; Trp53^{\Delta CE}$. A y A') Doble inmunofluorescencia para la detección de K5 (rojo) e incorporación de BrdU (verde) en folículos displásicos $Trp53^{\Delta CE}$ (A) y $Rb^{\Delta CE}; Trp53^{\Delta CE}$ (A'). Barra 100 μm . Se observa un mayor nivel de proliferación en los folículos $Rb^{\Delta CE}; Trp53^{\Delta CE}$. Detección de BrdU por medio de análisis inmunohistoquímico en tumores tempranos (B y B') y avanzados (C y C') de animales $Trp53^{\Delta CE}$ (B y C) y $Rb^{\Delta CE}; Trp53^{\Delta CE}$ (B' y C'). Barra 150 μm . D) Cuantificación del porcentaje de incorporación de BrdU en epidermis y folículos pilosos sin lesión, folículos displásicos y estadios tempranos y avanzados de los tumores de los genotipos de estudio. Los niveles de proliferación se igualan en los estadios más avanzados de los tumores $Trp53^{\Delta CE}$ y $Rb^{\Delta CE}; Trp53^{\Delta CE}$.

2. 6. Análisis de crecimiento de los tumores deficientes en p53 y en pRb y p53

Se ha analizado el grado de crecimiento de los tumores de ambos modelos $Trp53^{\Delta CE}$ y $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$, con el fin de determinar si el aumento de proliferación en folículos en los animales doble deficientes marca posibles diferencias de crecimiento con respecto a los tumores de animales $Trp53^{\Delta CE}$. Como las displasias y los tumores tempranos sólo son detectables mediante visualización histológica, los estudios de crecimiento se realizaron a partir de tumores avanzados aislados. Se produce un mayor aumento de volumen de los tumores de los animales $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$ ($n = 43$) comparado al de los tumores de los animales $Trp53^{\Delta CE}$ ($n = 23$) (fig. 28). Tal y como hemos mencionado anteriormente no se produce un aumento de proliferación progresivo en las distintas fases de malignidad de los tumores desarrollados en los animales $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$, alcanzándose además niveles similares en los estadios tumorales avanzados en los animales $Trp53^{\Delta CE}$ y $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$. Por este motivo descartamos el mecanismo de proliferación como el desencadenante del mayor crecimiento tumoral en los animales doble deficientes respecto a los $Trp53^{\Delta CE}$. De esta forma el aumento de crecimiento tumoral de los animales $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$ no se debe a fenómenos de proliferación, sino a otros mecanismos independientes que no tienen lugar en los animales $Trp53^{\Delta CE}$.

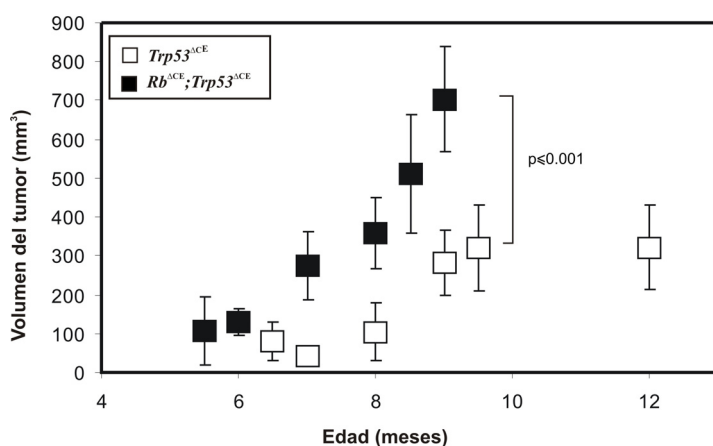


Figura 28. Crecimiento de los tumores espontáneos.

Representación del volumen medio de tumores aislados de animales de $Trp53^{\Delta CE}$ ($n = 23$) y $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$ ($n = 43$) a diferentes meses de edad. Se observa un aumento del crecimiento tumoral en los animales $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$. P, p-valor obtenido en el t-test de ambas muestras.

2. 7. Mecanismos moleculares de la cooperación funcional entre pRb y p53

Actualmente se desconocen los mecanismos de cooperación entre pRb y p53 en tumorigénesis epidérmica, aunque sí su relación con diversas vías de señalización ampliamente descritas en procesos tumorigénicos. Este es el caso de la vía PI3K/Akt, implicada en la regulación de múltiples procesos biológicos como apoptosis, metabolismo, proliferación, crecimiento y supervivencia celular (Carnero y col., 2008). p53 provoca la inactivación de esta vía debido a la inducción transcripcional de la fosfatasa PTEN, inhibidora de PI3K (Harris y Levine, 2005). Por otro lado, la señalización mediada por PI3K activa a Mdm2, desestabilizando por tanto a p53 (Lee y col., 2008). Nos propusimos conocer la implicación de esta vía de señalización en el desarrollo tumoral de los modelos animales *Trp53^{ΔCE}* y *Rb^{ΔCE};Trp53^{ΔCE}*. El estudio del grado de alteración de esta vía nos puede ayudar a encontrar los posibles mecanismos moleculares que permiten la mayor susceptibilidad tumoral de los animales *Rb^{ΔCE};Trp53^{ΔCE}*.

2. 7. 1. Incremento de actividad de Akt en los tumores deficientes en pRb y p53

Existe un gran número de vías de señalización implicadas en tumorigénesis. Estudios anteriores de nuestro grupo han demostrado que las vías dependientes de PI3K (fosfatidilinositol-3-OH quinasa) y de Ras/MEK/ERK, son fundamentales en la carcinogénesis epidérmica de ratón (Segrelles y col., 2006; Segrelles y col., 2002). La activación de estas vías favorece el incremento de actividad de determinadas quinasas diana como son Akt y ERK. La consecuencia funcional de esta activación repercute en el control del ciclo celular reprimiendo la acción de inhibidores de ciclo como p27 y p21 y permitiendo la expresión de determinadas ciclinas. Además, se reprimen procesos apoptóticos a través de la inhibición de factores de transcripción de la familia Foxo.

En los tumores desarrollados en los animales *Trp53^{ΔCE}* y *Rb^{ΔCE};Trp53^{ΔCE}* se realizaron estudios de la activación de Akt y ERK1/2 a través de la detección por técnicas de inmunohistoquímica de formas fosforiladas Akt-P y ERK1/2-P (fig. 29 A). En el caso de Akt se observó un aumento significativo de las formas fosforiladas en los tumores diferenciados doble deficientes en pRb y p53 frente a los originados en animales

deficientes en p53 en epidermis. En el caso de ERK se produce un aumento de los niveles de la forma fosforilada en la zona del estroma de los tumores. De acuerdo con el aumento de la forma fosforilada de Akt, se detectó un aumento de la localización nuclear de Ciclina D1 y una disminución de los niveles nucleares de Foxo3a, aumentando su localización citoplasmática, en tumores $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$ con respecto a los tumores $Trp53^{\Delta CE}$ (fig. 29 B).

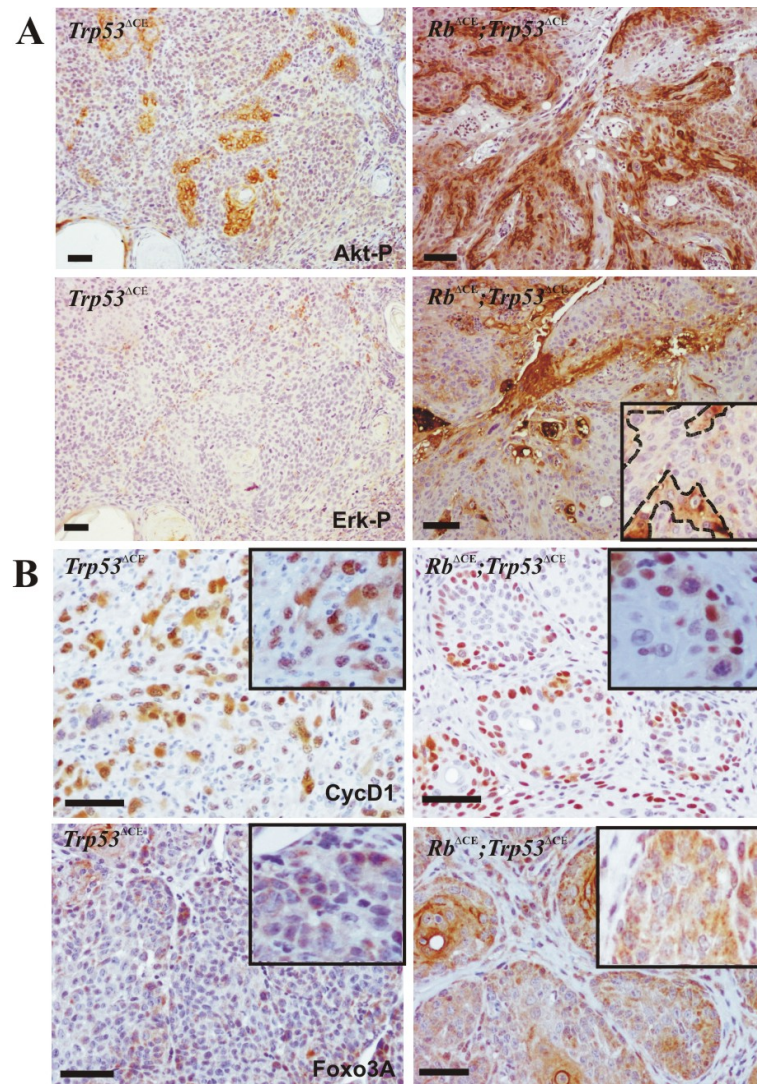


Figura 29. Estudios de la activación de las vías de Akt y MAPK/ERK en los tumores $Trp53^{\Delta CE}$ y $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$. A) Detección por inmunohistoquímica del aumento en la expresión de P-Akt y P-ERK en los tumores $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$ respecto a los $Trp53^{\Delta CE}$. B) Detección por inmunohistoquímica del aumento nuclear de Ciclina D1 y disminución nuclear de Foxo3A en los tumores $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$ respecto a los $Trp53^{\Delta CE}$. Barra, 150 μ m.

El incremento de la actividad de Akt podría estar relacionado con el aumento en la proliferación observada en los folículos pilosos de los animales doble deficientes y que

precede a la aparición tumoral. En este sentido se analizó a continuación si la activación de Akt es previa al desarrollo tumoral, pudiendo ser una de las causas del aumento de susceptibilidad de los animales doble deficientes. Para ello realizamos análisis bioquímicos de los niveles de proteínas en pieles no lesionadas de los distintos modelos animales. En las pieles no lesionadas de animales *Rb^{ACE};Trp53^{ACE}* se produce un aumento de Akt-P y una disminución de ERK1/2-P (fig. 30 A). Estos resultados indican que el aumento observado en los niveles de actividad de Akt se produce en estados pretumorales, mientras que la ausencia de incremento en la actividad de ERK indica que esta alteración podría tener lugar como consecuencia del proceso de progresión tumoral.

El aumento de la actividad de Akt, en el caso de tumores de tipo epidérmico, se ha asociado a la funcionalidad de determinados factores mitogénicos que actúan a través de diferentes receptores, como por ejemplo EGFR o IGFR. Mediante análisis de biochips a partir de pieles de recién nacido, se observa expresión diferencial en genes implicados en la vía de EGFR/Akt/ERK en los animales *Rb^{ACE};Trp53^{ACE}* (fig. 30 B. Anexo, tabla A2). Concretamente, se detecta una disminución en la expresión de *Errfi*, regulador negativo de la vía de señalización de EGFR, mientras que algunos de sus ligandos como son *Btc*, se encuentran sobreexpresados (fig. 30 B).

Por medio de análisis bioquímicos confirmamos que en las pieles de animales *Rb^{ACE};Trp53^{ACE}* se produce un incremento de la fosforilación en tirosina de EGFR que explicaría el aumento de la actividad, sin que se incrementen los niveles de proteína, y una disminución del regulador negativo *Errfi1* (fig. 30 A). Estos datos justifican el incremento de la actividad de Akt previamente observada en pieles no lesionadas.

Por medio de los análisis de biochips (fig. 30 B) observamos que en pieles de animales *Rb^{ACE};Trp53^{ACE}* se producen aumentos en los niveles de expresión de los genes *Igf2*, *Pdgfa* y *Pdpk1*, responsables en parte de la fosforilación de Akt y por tanto de su actividad. También se observa el aumento de la expresión de *Spry2*, cuyo producto, Sprouty2 inhibe la activación de la vía de MAPK inducida por la activación de EGFR (Shaw y col., 2007). Por *western blot* se detecta un ligero aumento en los niveles de proteína de Sprouty2 en piel de animales doble deficientes respecto a la piel de animales *Trp53^{ACE}* (fig. 30 A). El aumento de expresión de *Spry2* podría ser una de las razones de que la actividad de la vía de las MAPK, y por tanto de ERK, se encuentre disminuida. La

activación de EGFR conduce a un incremento en la actividad de Akt, pero no de ERK, en las pieles no lesionadas de animales doble deficientes, lo que podría ser uno de los desencadenantes del aumento de susceptibilidad tumorigénica en estos animales.

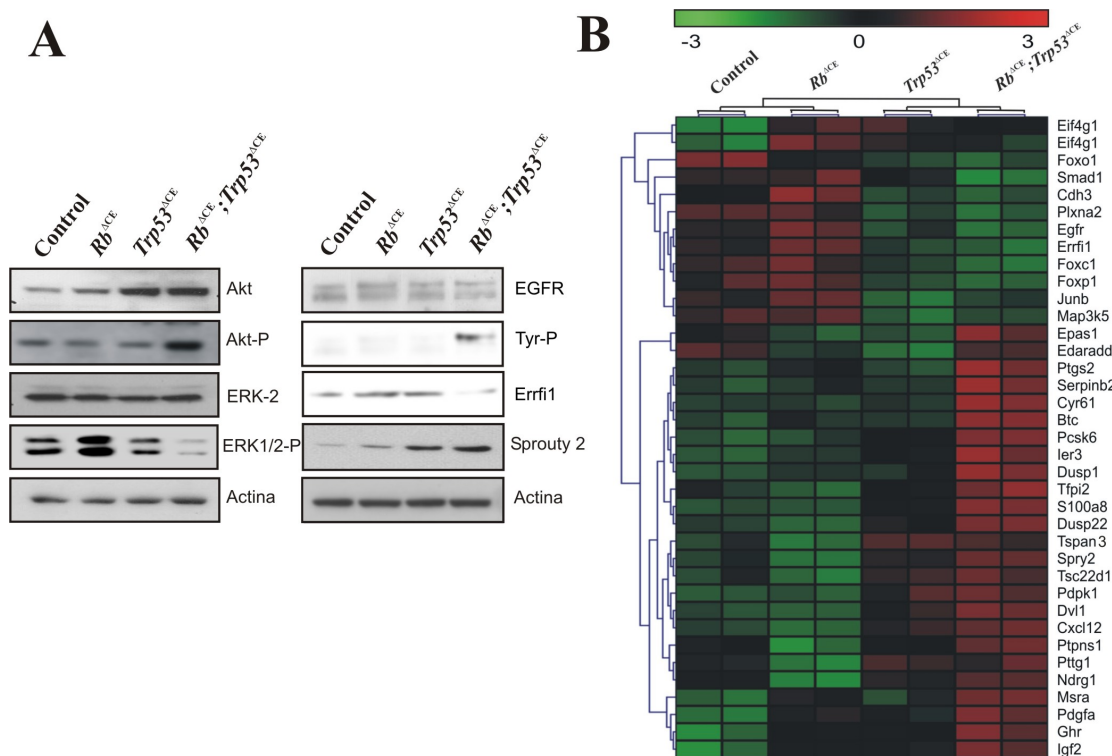


Figura 30. Estudios de la activación de las vías de Akt y MAPK/ERK en los tumores $Trp53^{\Delta CE}$ y $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$. A) Estudios bioquímicos por western blot a partir de pieles sin lesión de ratones adultos control, $Rb^{\Delta CE}$, $Trp53^{\Delta CE}$ y $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$. Se observa un aumento en la actividad de EGFR que conduce a una activación de Akt, pero no de ERK, debido posiblemente al aumento de expresión de Sprouty2 en pieles de animales $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$. B) Representación de la expresión relativa de genes implicados en las vías de Akt y ERK mediante análisis de biochips a partir de piel de recién nacido de ratones control, $Rb^{\Delta CE}$, $Trp53^{\Delta CE}$ y $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$. Los genes seleccionados por análisis de ANOVA ($p < 0.01$) incluyen, entre otros, a genes encargados de la fosforilación de Akt, reguladores de la vía de EGFR como Errfi e inhibidores de MAPK como Spry2 (Anexo, tabla A2).

2. 7. 2. Incremento de la respuesta angiogénica en los tumores deficientes en pRb y p53

Como se ha visto anteriormente, el incremento de la actividad Akt encontrado en pieles pretumorales y en tumores diferenciados de los animales $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$ podría ser responsable de la aceleración de la susceptibilidad en el desarrollo de los tumores espontáneos. La vía de señalización de Akt está implicada en incrementos de la

proliferación y en disminución de la apoptosis (Vivanco y Sawyers, 2002). Además, estudios recientes de nuestro grupo han demostrado que la expresión de una forma constitutivamente activa de Akt en epidermis, induce formación espontánea de tumores y una alta susceptibilidad tumoral por carcinogénesis química a través de un incremento en señales proliferativas (Segrelles y col., 2007). A pesar de esto, no encontramos alteraciones en la proliferación ni en la apoptosis en estadios avanzados de los tumores $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$ comparado con lo que se observa en los tumores $Trp53^{\Delta CE}$, mientras que se produce un incremento significativo en el crecimiento de los tumores $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$. Esto podría deberse a algún otro proceso implicado en la tumorigénesis de los animales doble deficientes. Existen amplias evidencias de la relación de la señal de Akt/PTEN en procesos de angiogénesis tumoral. Estudios anteriores en nuestro grupo permitieron observar que Akt podría mediar de forma específica una respuesta angiogénica en queratinocitos a través de mecanismos postranscripcionales (Segrelles y col., 2006; Segrelles y col., 2004). En base a estos datos se inició el estudio de las posibles alteraciones en la angiogénesis que podían producirse en los tumores de los animales $Trp53^{\Delta CE}$ y $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$. Para ello se analizó la vascularización realizando tinciones para CD31 (endothelial junction molecule) en cortes en congelación de los tumores. Los vasos observados son similares a los que se observan en carcinomas poco diferenciados según otros estudios (Bolontrade y col., 1998). Se detectó un incremento en el número de vasos sanguíneos en los tumores de animales doble deficientes respecto a los tumores de animales $Trp53^{\Delta CE}$ (fig. 31 A y C).

Para verificar este hecho de una forma cuantitativa se realizó un conteo de los vasos CD31 positivos y se calculó el área ocupada por ellos. La densidad de vasos y el área ocupada es mayor en los tumores $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$ con respecto a los $Trp53^{\Delta CE}$ (fig 32 A y B). El aumento de la respuesta angiogénica se comprobó al observar que el número de vasos maduros, que coexpresaban CD31 y el marcador de pericitos αSma , es más reducido en los tumores de animales doble deficientes en comparación con los tumores deficientes sólo en p53 (fig 31 B y D; fig. 32 C). La presencia de más vasos inmaduros es uno de los indicativos de que se dispare una mayor respuesta angiogénica en los tumores de animales $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$.

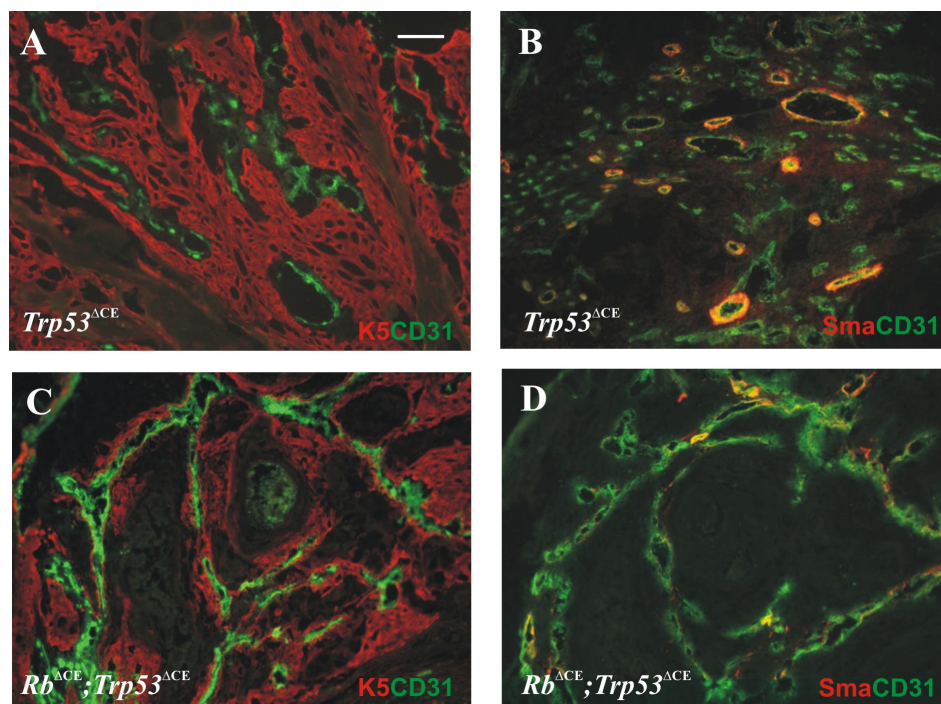


Figura 31. Análisis de la expresión de CD31 y α Sma en tumores de animales $Trp53^{\Delta CE}$ y $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$. Doble inmunofluorescencia en criocortes para la detección de K5 (rojo) y CD31 (verde) donde se observa un aumento en la expresión de CD31 en los tumores $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$ (C), respecto a los $Trp53^{\Delta CE}$ (A). Doble inmunofluorescencia en criocortes para la detección de α Sma (rojo) y CD31 (verde) donde observamos una disminución de vasos maduros que coexpresan CD31 y α Sma en los tumores de animales $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$ (D) con respecto a los $Trp53^{\Delta CE}$ (B). Barra, 100 μ m.

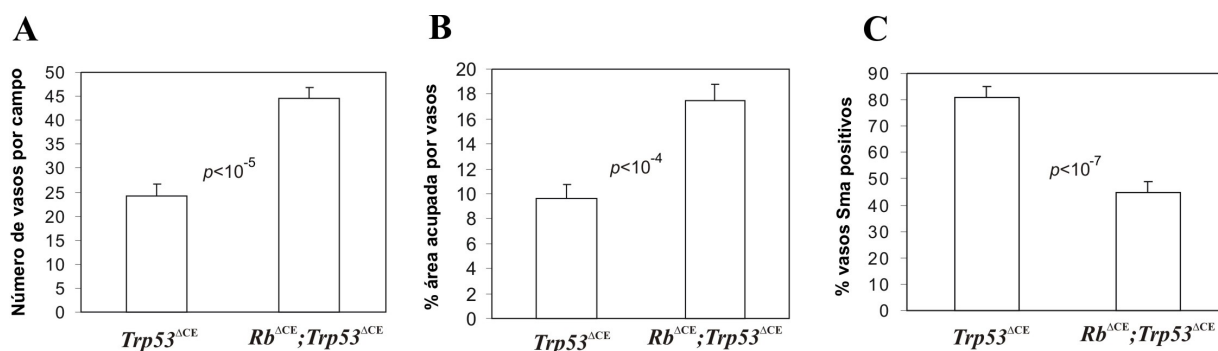


Figura 32. Análisis cuantitativo del área cubierta por vasos y número de vasos CD31 positivos y α Sma positivos en tumores de animales $Trp53^{\Delta CE}$ y $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$. Se observa un incremento en el porcentaje del área ocupada por vasos (A), en el número de vasos por campo (B) y una disminución en el porcentaje de vasos Sma positivos (C) en los tumores $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$ respecto a los $Trp53^{\Delta CE}$. P, p-valor obtenido en el t-test entre ambas muestras.

Mediante estudios génicos de biochips a partir de pieles pretumorales (fig. 33. Anexo, tabla A3) se comprueba que se produce una alteración de la angiogénesis en etapas previas al desarrollo tumoral. Se detecta un aumento en la expresión de múltiples factores angiogénicos como son *Pdgfa*, *Pitx2* y *Ptgs2* (ciclooxigenasa 2) y disminución en la expresión de moléculas antiangiogénicas como son *Foxo1*, *Col18a1* (endostatina) y *Timp3* en los animales deficientes en pRb y p53. Estos resultados indican que el incremento del crecimiento de los tumores $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$ se asocia a un incremento en la angiogénesis.

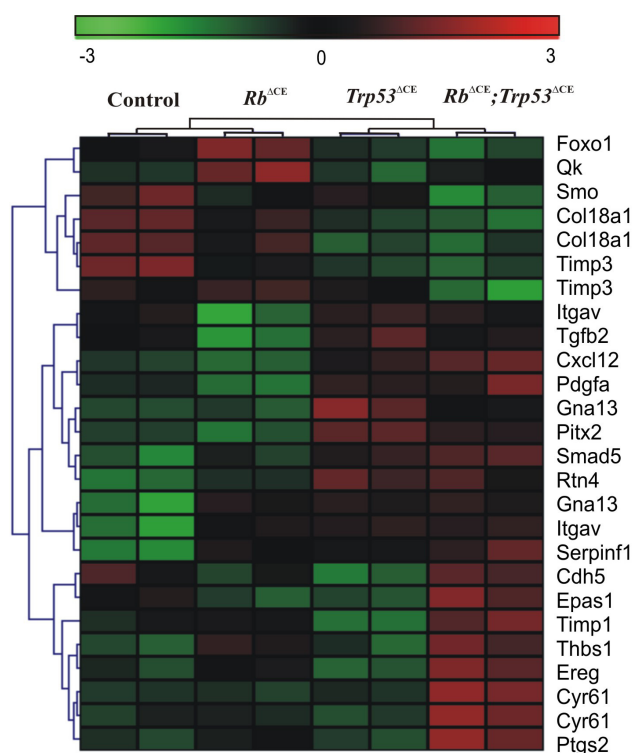


Figura 33. Genes implicados en angiogénesis diferencialmente expresados en los distintos genotipos de estudio. Representación de la expresión relativa de genes implicados en angiogénesis tras análisis de biochips a partir de piel de recién nacido de ratones control, $Rb^{\Delta CE}$, $Trp53^{\Delta CE}$ y $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$. Entre los genes seleccionados por análisis de ANOVA ($p < 0.01$) se observa una sobreexpresión de factores angiogénicos (*Pitx2*, *Pdgfa*, *Ptgs2*) y disminución en la expresión de moléculas antiangiogénicas (*Foxo1*, *Col18a1*, *Timp3*) en las pieles de los ratones $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$ (Anexo, tabla A3).

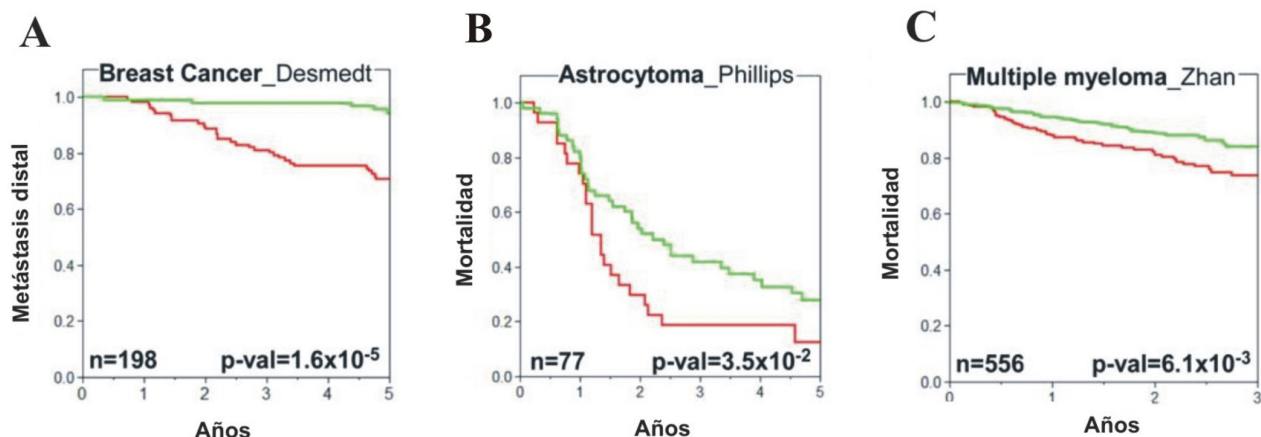
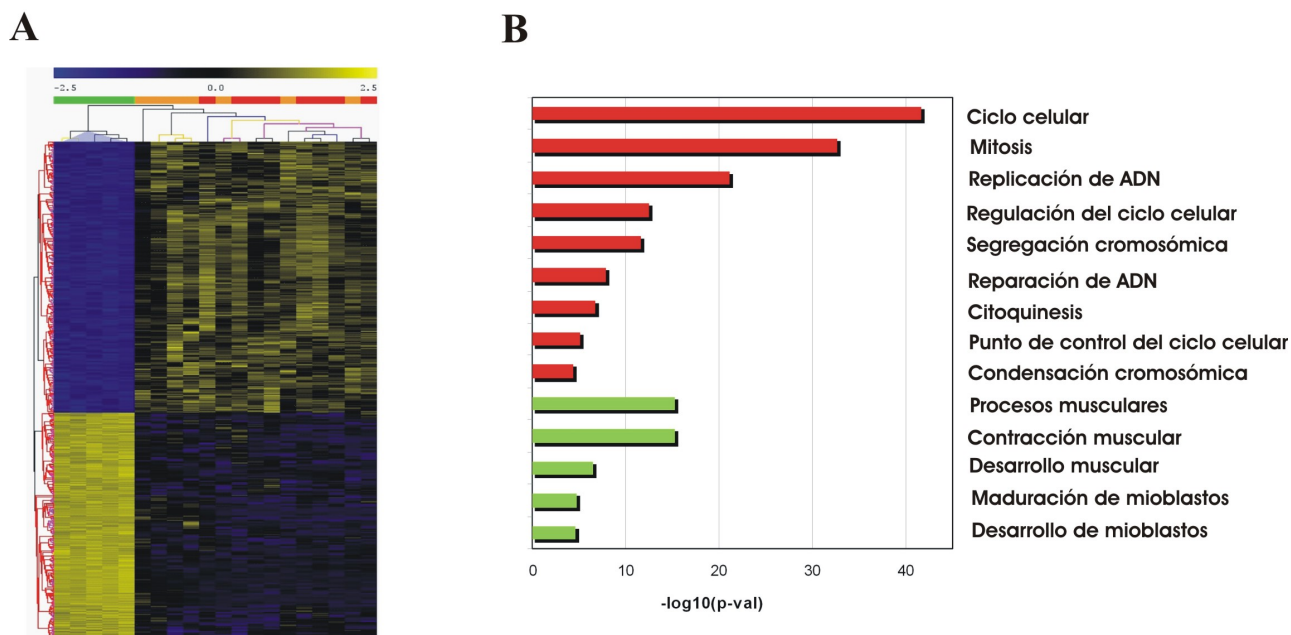
2. 8. Análisis de expresión génica de tumores $Trp53^{\Delta CE}$ y $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$. Comparación génica con tumores humanos y con firmas de células madre embrionarias humanas

Debido a las características histológicas y de malignidad de los tumores desarrollados en nuestros modelos, así como el hecho de que el precursor de la aparición tumoral en ellos es la ausencia de p53, se planteó comparar los tumores de los ratones con tumores humanos malignos, muchos de los cuales poseen mutaciones en el gen *Tp53*, y buscar así posibles similitudes entre ellos.

2. 8. 1. Obtención de una firma génica a partir de los tumores murinos deficientes en p53 capaz de clasificar pacientes de cánceres humanos en grupos de mal o buen pronóstico

Se realizaron análisis de chips de muestras tumorales *Trp53*^{ΔCE} (n = 7), *Rb*^{ΔCE};*Trp53*^{ΔCE} (n = 8) y pieles de animales control de dos meses (n = 5). A partir de los análisis de expresión diferencial de los tumores (SAM y T-test) obtuvimos un grupo de 682 sondas de las que 371 estaban sobreexpresadas y 311 reguladas negativamente (anexo, tablas A4 y A5). Estas 682 sondas tienen un patrón de expresión similar en ambos genotipos, tal y como se observa tras agrupamiento jerárquico no supervisado de las muestras, por lo que se trata de una firma o huella genómica de tumores murinos originados a partir de la pérdida somática de p53 (“firma p53”) (fig. 34 A). Tras un análisis de enriquecimiento de procesos biológicos por *Gene Ontology*, comprobamos que la mayoría de los genes sobreexpresados están implicados en replicación y reparación del ADN, y en regulación de los puntos de control del ciclo celular. Los genes de expresión disminuía en los tumores participan en funciones implicadas en fisiología y desarrollo muscular, debido seguramente a que las muestras tumorales llegan a invadir y degradar el músculo, presente por el contrario en la dermis de las pieles control (fig. 34 B).

Para determinar si los genes sobreexpresados en los tumores de ratón podían ser capaces de clasificar cánceres humanos en grupos de buen o mal pronóstico, hicimos uso de tres estudios de la base de datos GEO (NCBI) que representaban tres tipos de cáncer de distinto origen y evolución: mama (n = 198), astrocitoma (n = 77) y mieloma múltiple (n = 556). El análisis del agrupamiento jerárquico de los genes sobreexpresados en ratón en cada uno de los estudios de cáncer humano dio lugar a dos grupos de pacientes. Un primer grupo donde los genes homólogos en humano que aparecen sobreexpresados en nuestra “firma p53” aparecen también sobreexpresados (pacientes de mal pronóstico), y otro grupo donde estos mismos genes aparecen regulados negativamente (pacientes de buen pronóstico). A partir de los datos clínicos de evolución de los pacientes facilitados en los estudios de cáncer humano (metástasis distal ó mortalidad) comprobamos mediante curvas de Kaplan-Meier que los pacientes del primer grupo tienen un peor pronóstico que los del segundo grupo (fig 35 A, B y C). En resumen, los pacientes humanos que tienen patrones de expresión similares a la “firma p53” tienen más riesgo de desarrollar metástasis o de morir en al menos tres tipos de cánceres distintos.



2. 8. 2. Comparación entre la firma génica obtenida de los tumores murinos deficientes en p53 con firmas génicas de cáncer humano con mutaciones en *Tp53*

Los tumores desarrollados en nuestros modelos animales presentan un alto grado de indiferenciación y, como veremos más adelante, llegan a metastatizar. Los tumores sólidos humanos de alto grado de indiferenciación y con mutaciones en p53, también poseen capacidad metastásica, por lo que pensamos que los tumores de nuestros modelos murinos podrían servir como modelo para estos tipos de cánceres humanos.

Para estudiar esta posibilidad se utilizó el análisis *Molecular Concepts Map* (MCM) por el que se compararon los 371 genes sobreexpresados en las muestras tumorales murinas (previamente mapeadas para obtener los genes humanos homólogos) con estudios de cáncer humano hallados en la base de datos de biochips de cánceres humanos “Oncomine” (www.oncomine.org) (Rhodes y col., 2007).

En primer lugar se analizó si los genes sobreexpresados en los tumores de ratón correlacionaban con el estado de p53 de cánceres humanos, comparándolos para ello con patrones de expresión génica de muestras de cáncer humano con mutaciones en p53 (seis estudios; $n = 537$). Encontramos un alto grado de solapamiento (significancia: $p < 10^{-5}$ a $p < 10^{-68}$) de los tumores murinos con diversos tumores humanos de tipo epitelial y hematológico (fig 36 A. Anexo, tabla A6). De este modo se deduce que la pérdida de p53 provoca cambios de expresión génica de gran similitud en los tumores de nuestros modelos animales y en cánceres humanos. La firma p53 obtenida de los modelos murinos es capaz por tanto de distinguir tumores humanos de diversas localizaciones en función de la presencia de mutaciones en p53. Se realizaron comparativas entre todos los genes seleccionados para cada estudio, y se seleccionaron aquellos coincidentes en al menos cuatro de ellos y cuyo valor de significancia no sobrepasara el valor 0.05. En total se obtuvieron 32 genes que representaban una firma molecular común de tumores de ratón y humano asociada a mutaciones en p53 (fig 36 B).

2. 8. 3. Comparación entre la firma génica obtenida de los tumores murinos deficientes en p53 con firmas génicas de cáncer humano de mal pronóstico

A continuación, y haciendo uso de igual forma de estudios de la base de datos “Oncomine” y del análisis por MCM, se buscó solapamiento entre los genes sobreexpresados en los tumores de ratón, con cánceres humanos malignos de mal pronóstico (considerando

como factor de malignidad aquellos tumores que habían conducido al fallecimiento del paciente). Se consideraron para ello un total de 21 estudios con un total de 1801 muestras humanas. Se encontró un alto grado de solapamiento (significancia: $p\text{-val} < 10^{-4}$ a $p\text{-val} < 10^{-55}$) de los genes sobreexpresados en los tumores murinos con los de cánceres humanos sólidos de distintos orígenes (mama, cerebro, vejiga, riñón) y hematológicos (leucemia) (fig. 36 A. Anexo tabla A6). El solapamiento entre la “firma p53” de los modelos animales y genes diferencialmente expresados en cánceres humanos altamente agresivos, sugiere que los tumores murinos podrían servir de modelo de progresión maligna y de mal pronóstico de tumores humanos. Entre todos los genes seleccionados para cada estudio se realizaron comparativas para obtener los genes coincidentes en al menos 11 de ellos y con valor de significancia que no sobrepasara el $p\text{-val}=0.05$. En total se obtuvieron 40 genes que constituyen una firma molecular representativa de malignidad en cánceres humanos (fig. 36 C).

De forma llamativa, de esos 40 genes, 19 solapan con los genes de la anterior comparativa asociada a mutaciones en p53 (con asterisco, fig. 36 C). Esto indica que los determinantes de la malignidad tumoral pueden aparecer a partir de la mutación de p53, y corrobora que las mutaciones o la pérdida de funcionalidad de p53 es un mecanismo clave en la malignidad de los cánceres humanos.

2. 8. 4. Enriquecimiento de los tumores murinos deficientes en p53 en genes propios de células madre humanas

Los cánceres humanos metastásicos se caracterizan por tener programas de expresión similares a los que poseen las células madre embrionarias, presentando además enriquecimiento en genes diana de reguladores que conducen a la reprogramación de células adultas a células madre (Oct4, Sox2, Nanog, etc...) y en genes diana del oncogén c-Myc, regulador de la diferenciación. Por el contrario, presentan represión de genes diana del complejo represor *polycomb*, también implicados en procesos de reprogramación de células madre (Ben-Porath y col., 2008).

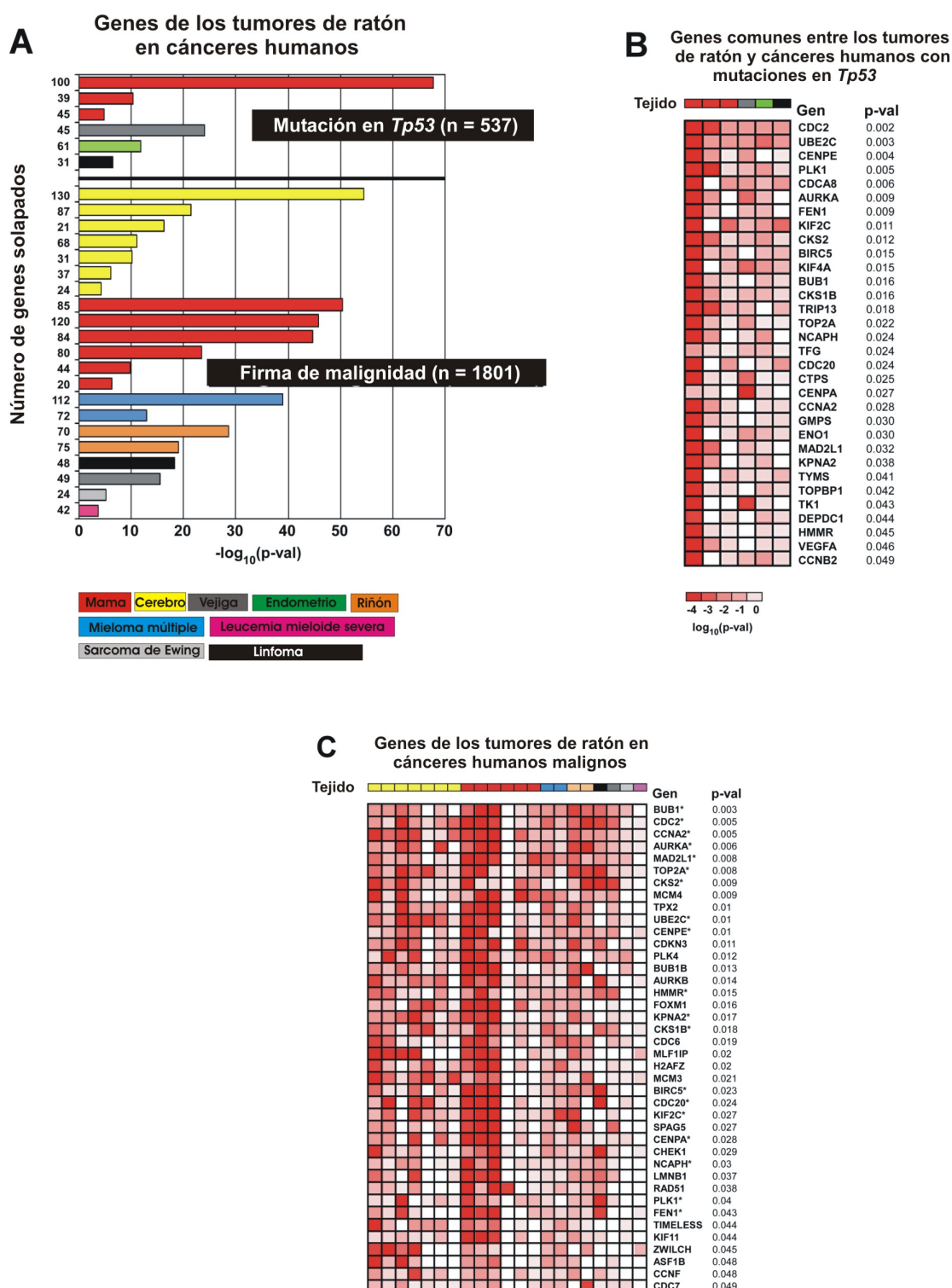


Figura 36. Los tumores de ratones *Trp53^{ACE}* o *Rb^{ACE};Trp53^{ACE}* presentan características moleculares similares a cánceres humanos. A) Genes de los tumores de ratón coincidentes con genes de diversos tipos de cáncer (con mutaciones en *Tp53* o firmas de malignidad). Las barras indican la significancia del solapamiento. *n*, número de cánceres humanos analizados. B) Selección de 32 genes comunes en tumores de ratón y humano asociados a mutaciones en *Tp53*. C) Selección de 40 genes comunes en tumores de ratón y humano asociados a malignidad. Con asterisco, genes coincidentes entre B y C. *p-val*, significancia del análisis.

Mediante análisis por GSEA (“Gene Set Enrichment Analysis”) comprobamos el grado de enriquecimiento de los tumores murinos en genes propios de células madre humanas. Para ello se utilizaron diversas firmas previamente descritas (Ben-Porath y col., 2008) (tabla 1). Observamos que los tumores murinos están enriquecidos en genes sobreexpresados en células madre embrionarias humanas y en dianas de c-Myc, Sox2 y Nanog. Por otro lado, los tumores tienen regulados negativamente los genes dianas del complejo represor *polycomb*, como son los genes regulados por H3K27, PRC2, EED, y SUZ12 (tabla 2).

GSEA de firmas de células madre humanas

Nombre del set de genes (N)	Número de genes enriquecidos	NES	FDR q-valor
ES EXP1 (315)	128	2.16	< 0.0001*
ES EXP2 (32)	9	1.89	< 0.0001*
MYC Targets2 (664)	182	1.63	0.0022*
SOX2 Targets (584)	166	1.54	0.0058*
MYC Targets1 (199)	55	1.47	0.013*
NANOG Targets (797)	225	1.38	0.021*
OCT4 Targets (242)	63	1.22	0.068
NOS Targets (152)	32	1.08	0.23
H3K27 BOUND (886)	245	-1.65	0.0026*
PRC2 Targets (508)	126	-1.59	0.0038*
EED Targets (800)	183	-1.55	0.0042*
SUZ12 Targets (819)	201	-1.65	0.005*
NOS TFS (32)	5	-1.08	0.24

N: Número de genes de cada set en el chip de ratón

NES: Normalized enrichment score

NES>0: Enriquecimiento en tumores

NES<0: Enriquecimiento en piel normal

* Enriquecimiento significativo

Tabla 2. Enriquecimiento de los tumores de ratones *Trp53^{ACE}* o *Rb^{ACE}*; *Trp53^{ACE}* en genes propios de células madre humanas. Número de genes de los tumores de ratón coincidentes con genes descritos por diversas firmas de células madre humanas. El enriquecimiento se produce sobre todo en genes diana para c-myc, Sox2 y Nanog, mientras que aparecen regulados negativamente genes diana del complejo *polycomb*.

Con estos análisis se demuestra que los tumores murinos deficientes en p53 presentan patrones de expresión génica similares a los que presentan las células madre humanas. Este resultado sugiere que las células de los tumores murinos podrían tener características fenotípicas similares a las células madre.

3. Transición epitelio-mesénquima (TEM) y metástasis de los tumores

3.1. Análisis de la proporción de carcinomas de células fusiformes en animales deficientes en p53 y en pRb y p53

El análisis histológico de los carcinomas desarrollados en nuestros modelos animales nos hizo observar que un elevado porcentaje de los tumores desarrollados (21%) corresponde a carcinomas de células fusiformes, estado más agresivo e invasivo de los carcinomas escamosos (fig. 37 A). La media de edad de aparición de estos tumores es más temprana en el caso de los animales doble deficientes (6 meses aproximadamente), con respecto a los animales deficientes en p53 (7 meses aproximadamente) (fig. 37 B). A pesar de esto, la tasa de conversión de los SCCs a carcinomas de células fusiformes es similar en ambos genotipos (fig. 37 C). Las características invasivas de este tipo de tumor son evidencia de que se puedan producir fenómenos de TEM en los tumores primarios de los modelos *Trp53^{ACE}* y *Rb^{ACE};Trp53^{ACE}*. Sin embargo, los datos anteriores sugieren que estos procesos no estarían incrementados en los animales doble deficientes con respecto a los animales deficientes en p53.

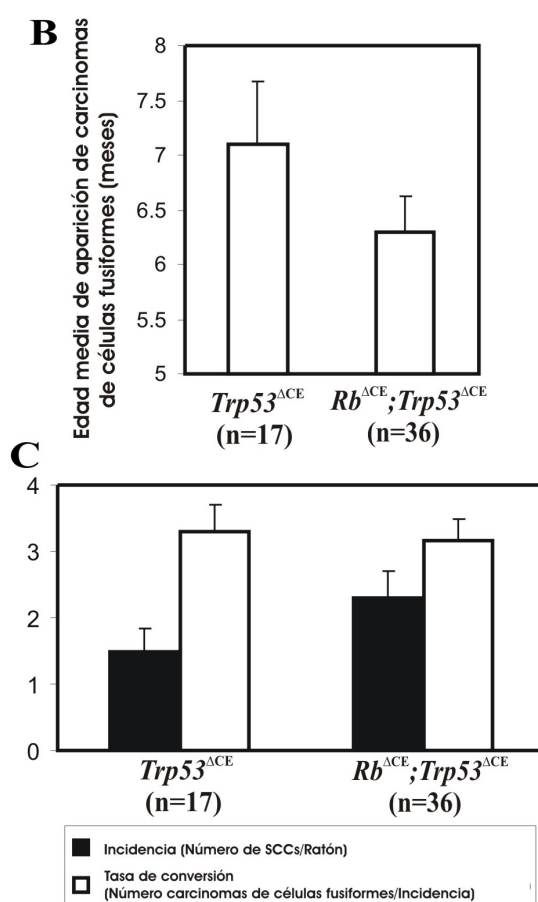
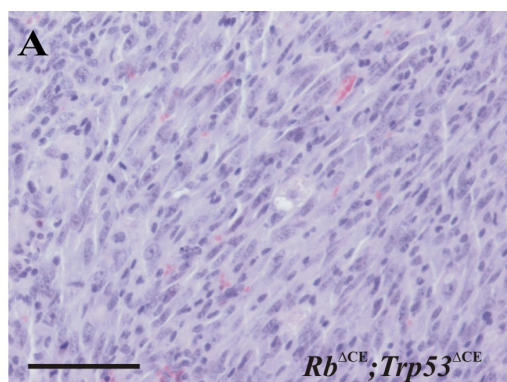


Figura 37. Proporción de carcinomas de células fusiformes desarrollados en los animales $Trp53^{\Delta CE}$ y $Rb^{\Delta CE}; Trp53^{\Delta CE}$.

A) Hematoxilina-eosina de un carcinoma de células fusiformes donde se puede apreciar la morfología mesenquimal de las células. Barra, 100 μ m. B) La edad media de aparición de carcinomas de células fusiformes en los animales $Rb^{\Delta CE}; Trp53^{\Delta CE}$ es más temprana que en los $Trp53^{\Delta CE}$. C) Tasa de conversión de los SCCs a carcinomas de células fusiformes considerando la incidencia de aparición de carcinomas por animal $Trp53^{\Delta CE}$ o $Rb^{\Delta CE}; Trp53^{\Delta CE}$. Se obtienen tasas similares en ambos genotipos.

3.2. Proceso de TEM en los tumores deficientes en p53

Como hemos comentado anteriormente, un 21% de los SCCs desarrollados en los modelos animales $Trp53^{\Delta CE}$ y $Rb^{\Delta CE}; Trp53^{\Delta CE}$ se corresponde a carcinomas de células fusiformes, formas muy indiferenciadas del tumor. Esto sugiere que se pueden producir procesos de TEM en los tumores primarios de los animales. Se inició por tanto un estudio de estos procesos. La visualización histológica de los tumores indiferenciados (fig. 37 A), la conversión de SCC a carcinoma de células fusiformes (fig.

37 C) y los análisis genómicos que se realizaron en los tumores (resultados 2. 8.), demostraron las similitudes existentes entre los tumores desarrollados en los animales *Trp53^{ΔCE}* y en los animales *Rb^{ΔCE};Trp53^{ΔCE}*. Por este motivo incluimos los tumores de ambos modelos animales en el estudio del proceso de TEM.

Una evidencia clara de que en un carcinoma se está produciendo un cambio de morfología en sus células debido a un proceso de TEM, es la pérdida de E-cadherina y el aumento de marcadores mesenquimales, como por ejemplo vimentina (Gupta y col., 2007; Wells y col., 2008). Mediante técnicas de inmunohistoquímica observamos que se produce una disminución de E-cadherina y un aumento de vimentina (fig. 38) en zonas indiferenciadas con respecto a zonas más diferenciadas de los tumores.

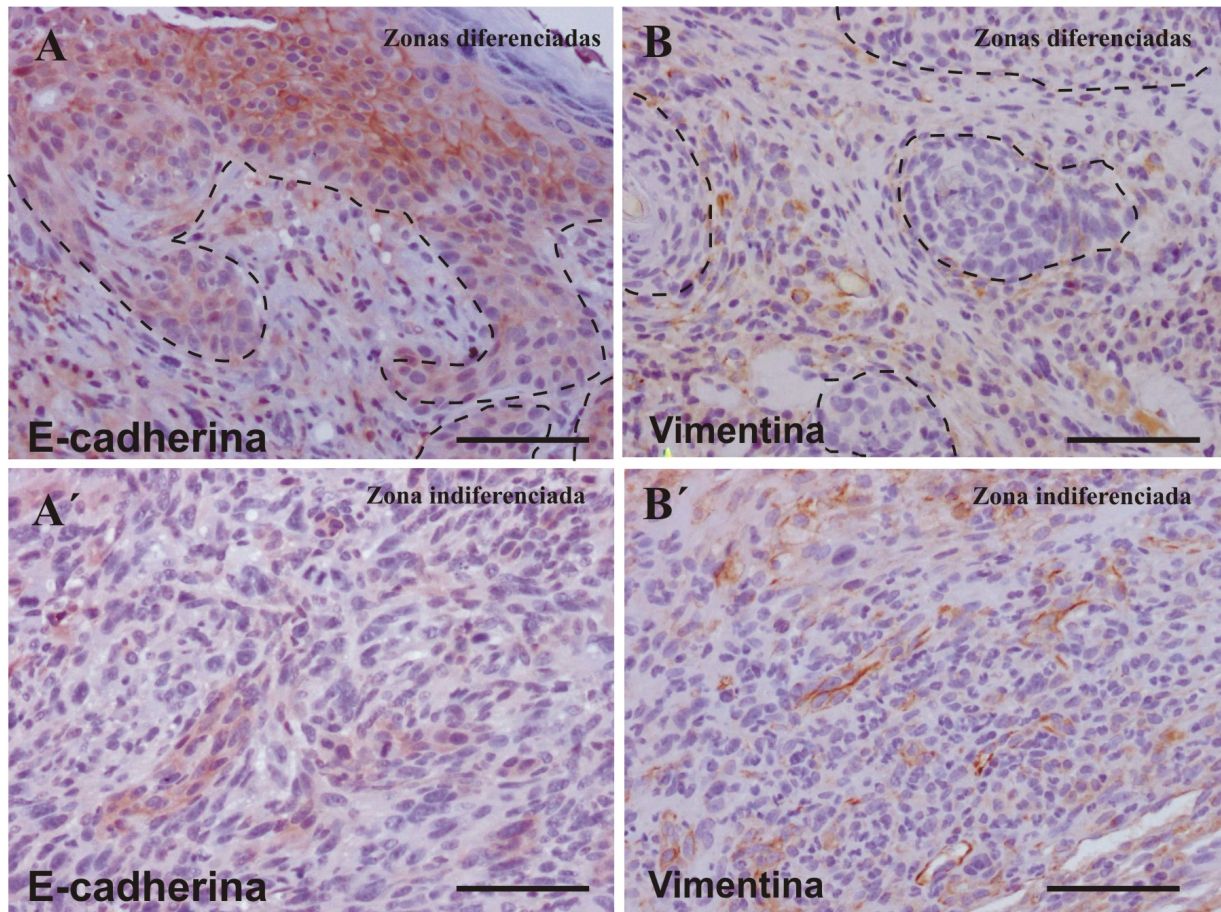


Figura 38. Disminución de E-cadherina y aumento de vimentina en los estados más indiferenciados del tumor. Detección por inmunohistoquímica de la expresión de E-cadherina (A y A') y vimentina (B y B') en tumores de los animales *Trp53^{ΔCE}* y *Rb^{ΔCE};Trp53^{ΔCE}*. Se produce una disminución de los niveles de E-cadherina y un aumento de vimentina en las zonas más indiferenciadas de los tumores. Barra, 100 μ m. Delimitadas zonas diferenciadas en A y B.

A partir de análisis de los biochips de tumores se buscaron entre los genes seleccionados (1600 sondas), aquellos propios de células epiteliales, mesenquimales e implicados en TEM expresados diferencialmente en los tumores. Se produce un aumento de expresión génica de marcadores mesenquimales como TGF β , fibronectina, N-cadherina y vimentina, y una disminución de marcadores propios de células epiteliales como integrina β 6 y E-cadherina en aquellos tumores de células fusiformes, altamente indiferenciados (n = 7), con respecto a los más diferenciados (n = 8) (fig. 39 A) de forma independiente del genotipo. Analizando la expresión génica de diversos moduladores del proceso de TEM se observa que los tumores de células fusiformes presentan un aumento de expresión de genes implicados en dicho proceso como son *Tcf8* (ZEB1), *Zfhx1b* (ZEB2), *Twist1*, *FoxC2* y *Snai1* (fig. 39 B).

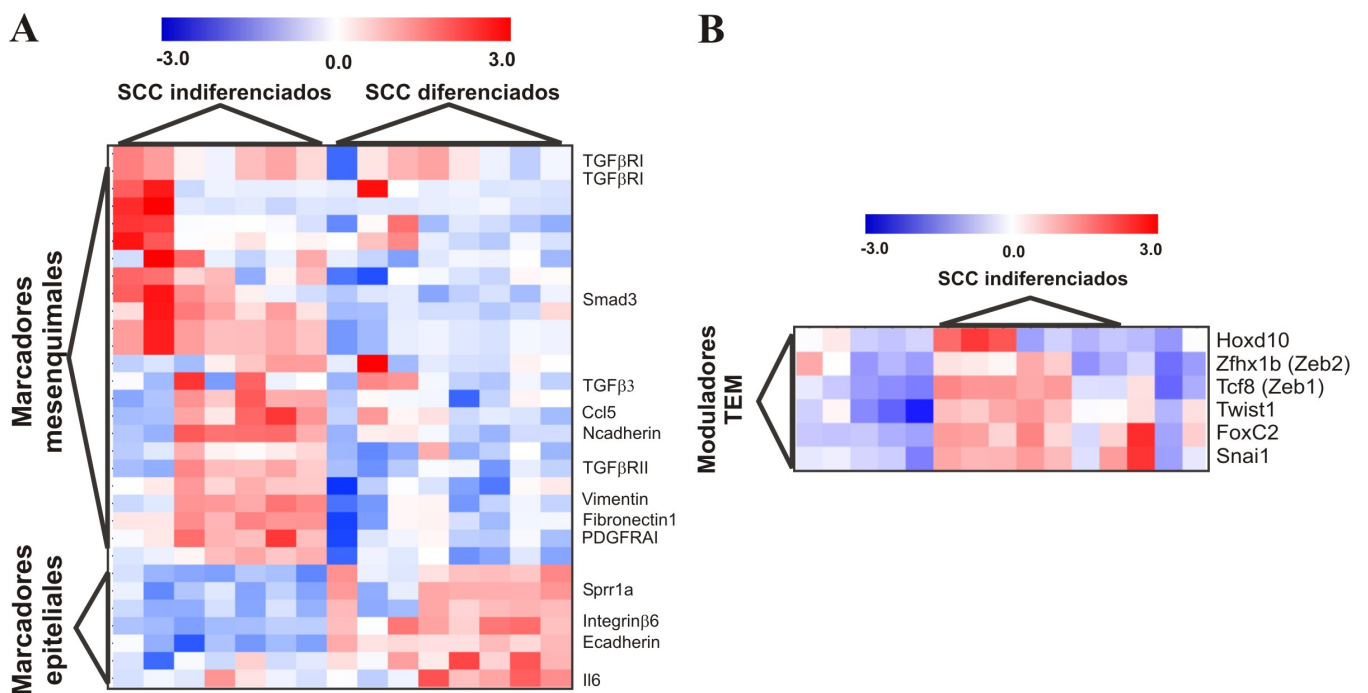


Figura 39. Aumento de la expresión génica de marcadores mesenquimales y moduladores de TEM y disminución de marcadores epiteliales en tumores indiferenciados. A) Representación de la expresión relativa de una selección de marcadores mesenquimales y epiteliales tras análisis de biochips a partir de muestras tumorales, diferenciadas frente a indiferenciadas, de animales *Trp53*^{ΔCE} y *Rb*^{ΔCE};*Trp53*^{ΔCE}. B) Selección de moduladores de TEM en tumores indiferenciados frente a diferenciados.

Los análisis por *western blot* e inmunohistoquímica confirmaron el aumento de la expresión de algunos de estos moduladores de TEM en tumores indiferenciados (fig. 40 A, B, C y D).

Por tanto, existen evidencias moleculares que sugieren que en los tumores de los modelos $Trp53^{\Delta CE}$ y $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$ se producen procesos de TEM, lo que conduce a su conversión en carcinomas de células fusiformes con capacidad invasiva y metastásica. Además, este proceso se desarrolla por igual en los tumores $Trp53^{\Delta CE}$ y $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$, por lo que la pérdida de pRb no contribuye significativamente al proceso de TEM.

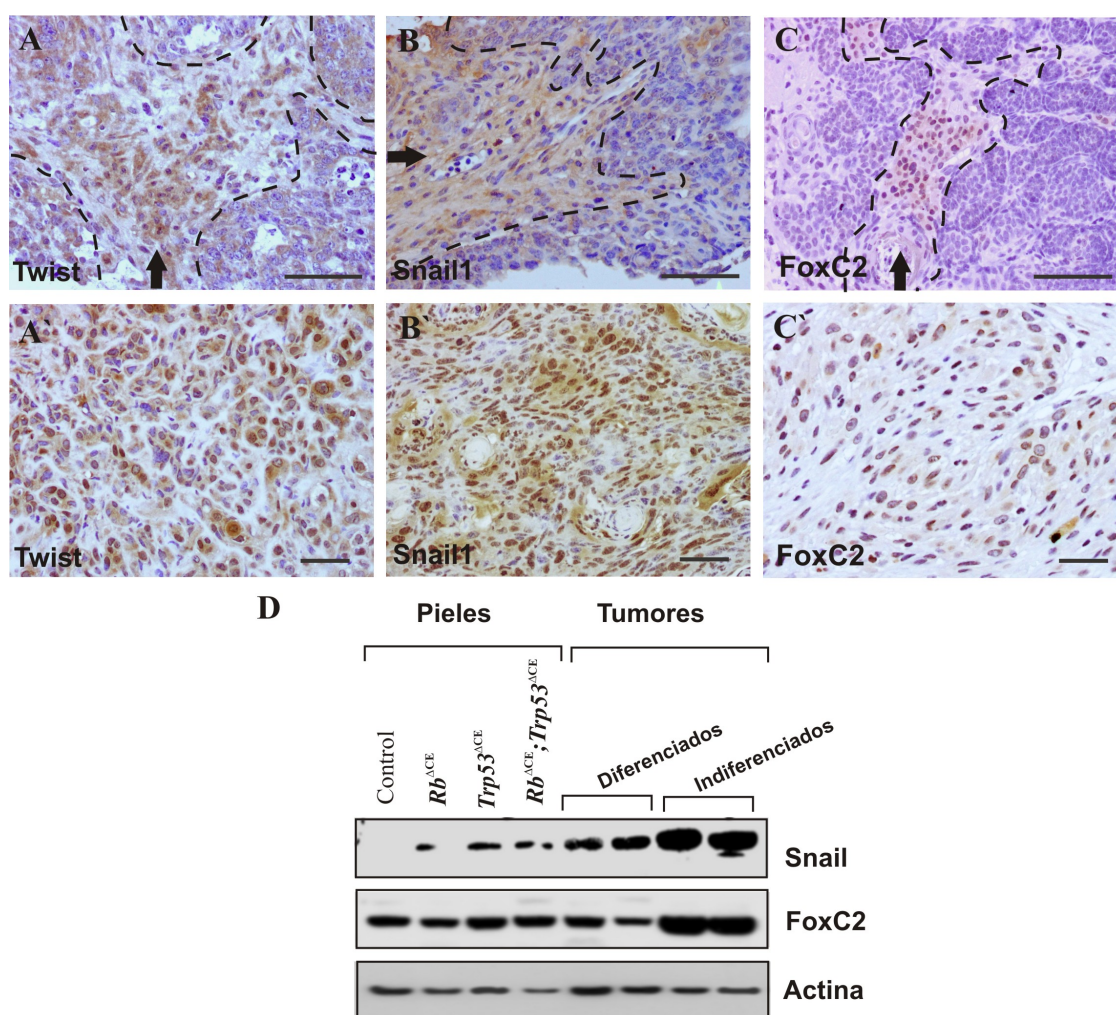


Figura 40. Aumento de la expresión de los moduladores de TEM Twist, Snail1 y FoxC2 en tumores indiferenciados. Detección por inmunohistoquímica de la expresión de Twist (A y A'), Snail1 (B y B') y FoxC2 (C y C') en las zonas más indiferenciadas del tumor. Barra, 100 μ m. Delimitadas zonas indiferenciadas en A, B y C. D) Análisis bioquímicos por *western blot* a partir de extractos proteicos de pieles sin lesión de ratones control, $Rb^{\Delta CE}$, $Trp53^{\Delta CE}$ y $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$ y tumores diferenciados e indiferenciados. La actina se utilizó como control de carga.

3. 3. Formación de metástasis en pulmón tras el desarrollo tumoral en animales deficientes en p53

Los procesos de TEM son evidencia clara de que el tumor primario maligniza y puede desarrollar metástasis en otras localizaciones. Además, los tumores de los modelos deficientes en p53 en epidermis, presentan enriquecimiento en genes de células madre humanas y poseen otras características génicas propias de tumores humanos metastáticos. Es esperable, por tanto, que los tumores espontáneos desarrollados en los animales *Trp53^{ΔCE}* y *Rb^{ΔCE};Trp53^{ΔCE}* produzcan metástasis.

Se realizó por ello un estudio para detectar posibles metástasis en hígado y pulmón de los animales *Trp53^{ΔCE}* y *Rb^{ΔCE};Trp53^{ΔCE}*. En los hígados analizados de animales con tumores primarios (n = 16), no encontramos ninguna evidencia clara de metástasis. Por el contrario, de los pulmones analizados de estos animales (n = 16), encontramos un total de 10 pulmones con focos metastáticos. La mayor parte de estos focos metastáticos fueron detectados a nivel histológico, aunque algunas veces la visualización se pudo hacer macroscópicamente (fig. 41 A y B). No hay diferencias significativas en la aparición de metástasis entre los animales *Trp53^{ΔCE}* y *Rb^{ΔCE};Trp53^{ΔCE}*. Además, en la mayoría de los casos, el tumor primario corresponde a un estado tumoral altamente indiferenciado y con evidencias de procesos de TEM (en 9 de los 10 casos). Se confirmó, mediante la detección por inmunohistoquímica de K5, la naturaleza epitelial de los focos en pulmón una vez que las células revierten de nuevo el fenotipo adquiriendo características epiteliales (fig. 41 B'). Mediante PCR de ADN genómico aislado del parénquima pulmonar, descartamos que estos focos se originasen como tumor primario a consecuencia de una recombinación inespecífica en pulmón. En el pulmón no se produce la delección de la secuencia de *Trp53* que tiene lugar en epitelios estratificados, por lo que los focos corresponden a un proceso metastático desde un tumor primario previamente originado en el animal.

Los análisis de imagen realizados por PET, revelan que, cuarenta días después de tener un tumor primario visible, se detectan áreas localizadas en la zona pulmonar que incorporan FDG (2-¹⁸F-fluoro-2-deoxi-D-glucosa) (fig. 42 A, A', A''). Se trata posiblemente de focos de células tumorales que incorporan el isótopo radiactivo. Las imágenes por PET (tomografía por emisión de positrones) no revelan la presencia del

isótopo en hígado o hueso. Posteriormente estos datos fueron confirmados por histología.

Como podemos observar por los resultados anteriores, los tumores primarios desarrollados por la deficiencia en p53 en los modelos animales $Trp53^{\Delta CE}$ y $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$, pueden llegar a formar metástasis en pulmón debido a la inducción de procesos de TEM.

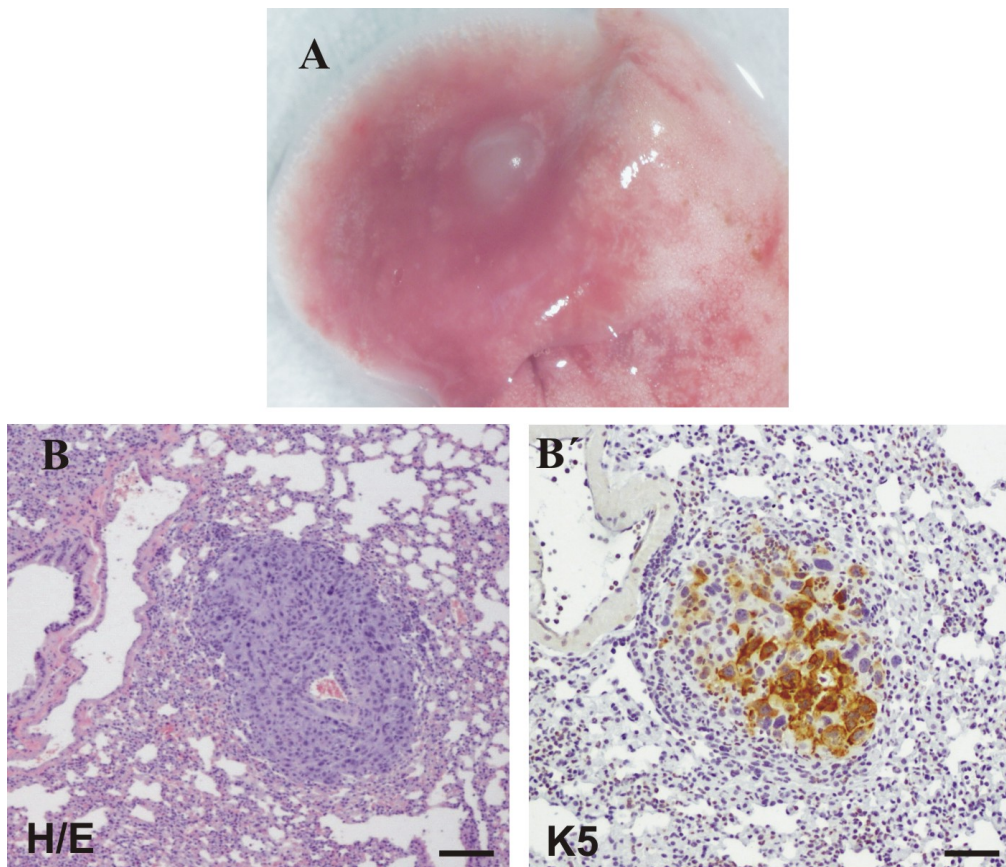


Figura 41. Detección de focos metastásicos en el pulmón. A) Imagen macrosocópica de una metástasis en pulmón. B) Hematoxilina-eosina de un foco metastásico localizado en el parénquima pulmonar. C) Inmunohistoquímica frente a K5 para confirmar la naturaleza epitelial del foco. Barra, 100μm.

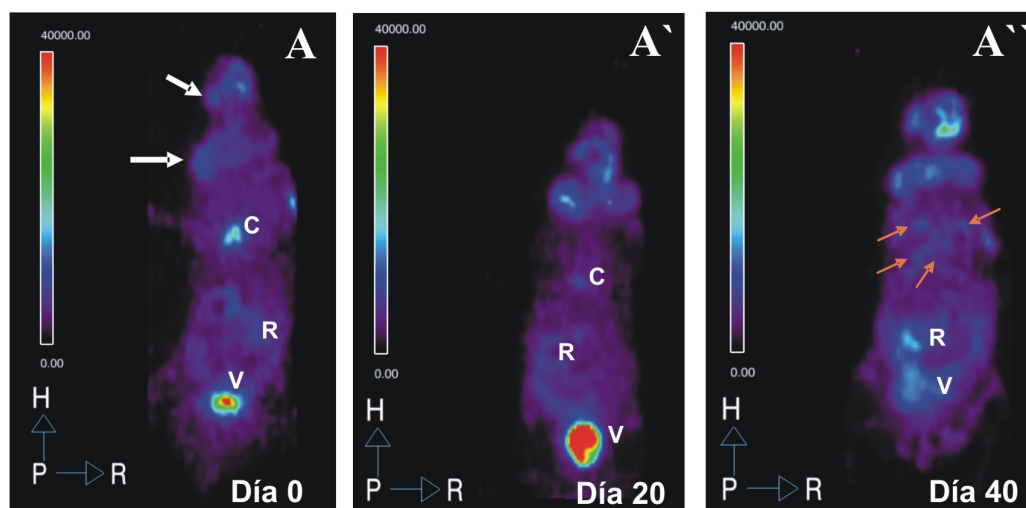


Figura 42. Análisis de imagen por PET de la presencia de focos metastásicos en pulmón. Detección por PET de las localizaciones de incorporación de FDG. A) Imagen donde se detecta la presencia de tumores primarios en hocico y cuello. B) Seguimiento de la evolución a los 20 días. C) A los 40 días se detecta la presencia de áreas de incorporación de FDG en la zona torácica. C, R y V, corazón, riñón y vejiga respectivamente, zonas de incorporación de FDG y por tanto de emisión.

3. 4. Implicación de los microARNs en TEM y metástasis

Determinados microARNs actúan como reguladores del proceso de TEM y metástasis, además de estar implicados en la diferenciación y en el mantenimiento de la homeostasis de la epidermis. Se realizó por tanto un estudio de la expresión de microARNs en los tumores de los modelos animales. Mediante análisis de biochips a partir de muestras tumorales, se seleccionaron por SAM y T-test 448 microARNs que se expresan diferencialmente en los tumores de los animales *Trp53^{ΔCE}* y *Rb^{ΔCE};Trp53^{ΔCE}* con respecto a pieles no tumorales (Anexo, tabla A7). Esta selección incluye un alto número de microARNs implicados en homeostasis epidérmica (fig. 43 A). Vemos por tanto que en los tumores se produce desregulación de ciertos microARNs que, en condiciones normales, mantienen el estado de diferenciación normal de la epidermis. Entre ellos se observa una expresión disminuida de miR-203, que al regular negativamente a p63, afecta la funcionalidad de las células madre epidérmicas (Aberdam y col., 2008; Lena y col., 2008; Yi y col., 2008). Destacamos también la sobreexpresión de miR-21, implicado en la regulación de la homeostasis epidérmica (Zavadil y col., 2007). Además, en los

tumores se expresan diferencialmente microARNs implicados en procesos de TEM y metástasis (fig. 43 B). Entre ellos volvemos a destacar la sobreexpresión de miR-21, microARN implicado en procesos de TEM debido a la regulación sobre la vía de TGF- β (Papagiannakopoulos y col., 2008; Zavadil y col., 2007). En los tumores se produce por tanto una importante desregulación de microARNs que regulan procesos metastáticos.

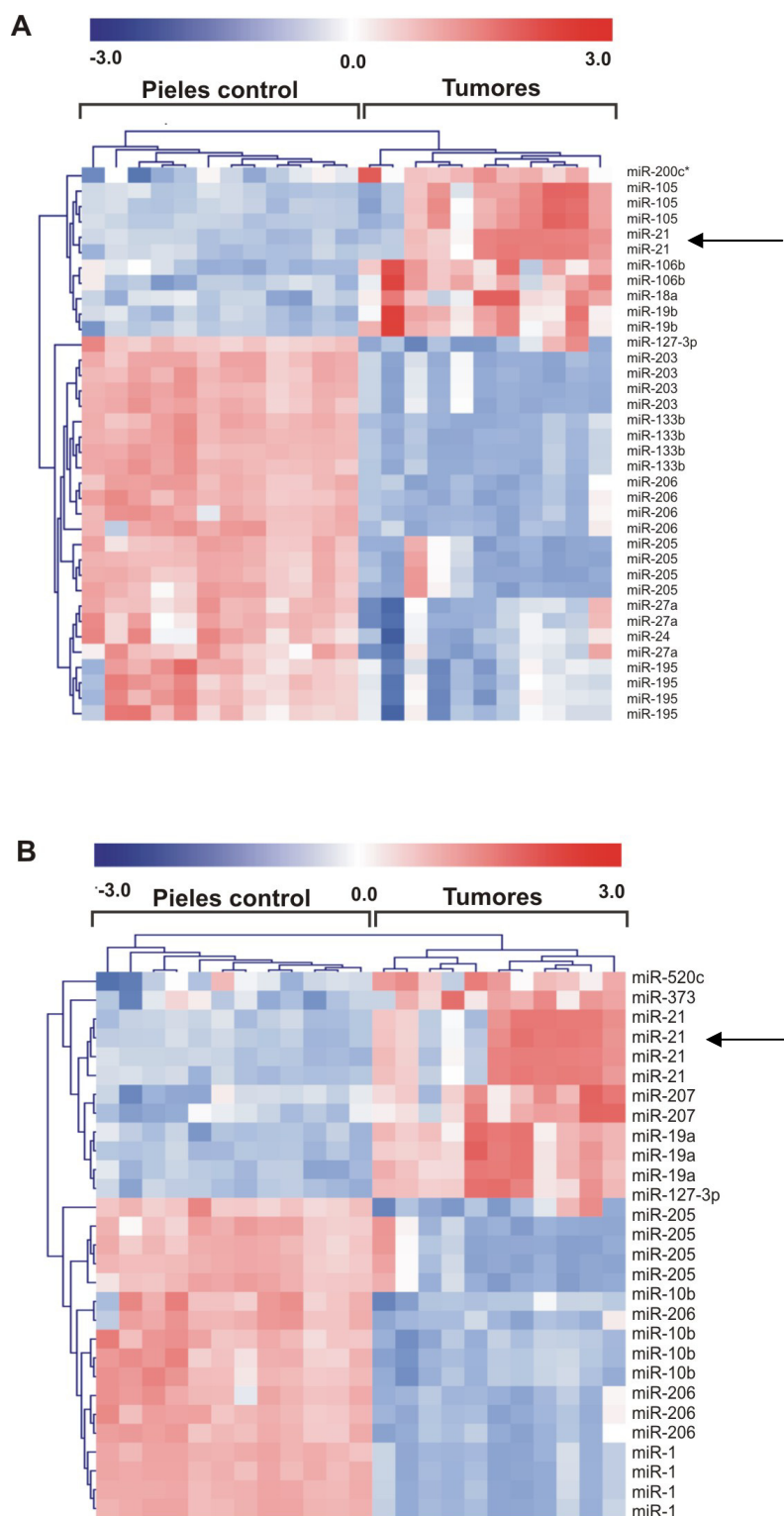


Figura 43. Análisis de la expresión diferencial de microARNs en muestras tumorales. Representación de microARNs expresados diferencialmente, seleccionados por su implicación en el mantenimiento de la homeostasis epidérmica (A) y en TEM y metástasis (B). Destacamos la sobreexpresión de miR-21 en el análisis.

Para determinar qué microARNs favorecen los procesos de malignización tumoral, realizamos, a partir de los 448 microARNs previamente seleccionados, un análisis de expresión diferencial entre tumores más o menos agresivos (diferenciados frente a indiferenciados). Como resultado obtuvimos 7 microARNs (fig. 44 A), entre los que aparece sobreexpresado miR-21.

Como vemos, a partir de dos tipos de análisis diferentes se detecta una sobreexpresión de miR-21 en los tumores en general y en sus estados más indiferenciados en particular. Esto sugiere que miR-21 es un buen candidato para intentar clarificar los mecanismos moleculares responsables de la malignización y metástasis a partir de procesos tumorales originados por la inactivación de p53. Por medio de análisis por PCR cuantitativa analizamos el nivel de expresión de miR-21 en 13 muestras tumorales de distinto grado de diferenciación. Los resultados obtenidos confirman que el aumento de expresión de miR-21 se produce en los tumores de mayor grado de indiferenciación, mientras que no ve incrementados sus niveles en función del genotipo del animal o de que el tumor sufra metástasis o no (fig. 44 B, C y D).

El microARN miR-21 se encuentra sobreexpresado en un gran número de cánceres humanos, asociándose en muchos casos a agresividad y metástasis (Chan y col., 2005; Ciafre y col., 2005; Iorio y col., 2005). Las distintas dianas sobre las que actúa están siendo motivo de estudio para llegar a entender cómo el aumento de su actividad afecta al proceso carcinogénico. Se conocen determinadas dianas reprimidas por miR-21 que inducen procesos apoptóticos, ya que engloban componentes de las vías de señalización de p53 y TGF- β entre otras (Papagiannakopoulos y col., 2008). La represión de estas vías a consecuencia de la desregulación de miR-21 contribuye a que tengan lugar procesos proliferativos y antiapoptóticos necesarios para la progresión tumoral. Además, miR-21 promueve mecanismos de tumorigénesis y metástasis por medio de la inhibición directa de la expresión de genes supresores tumorales como son PTEN y tropomiosina (TPM1) (Ma y Weinberg, 2008; Si y col., 2007). Otros estudios describen que miR-21 induce la actividad MAPK por medio de la inhibición de la expresión de *Sprouty*, regulador negativo de esta vía (Thum y col., 2008).

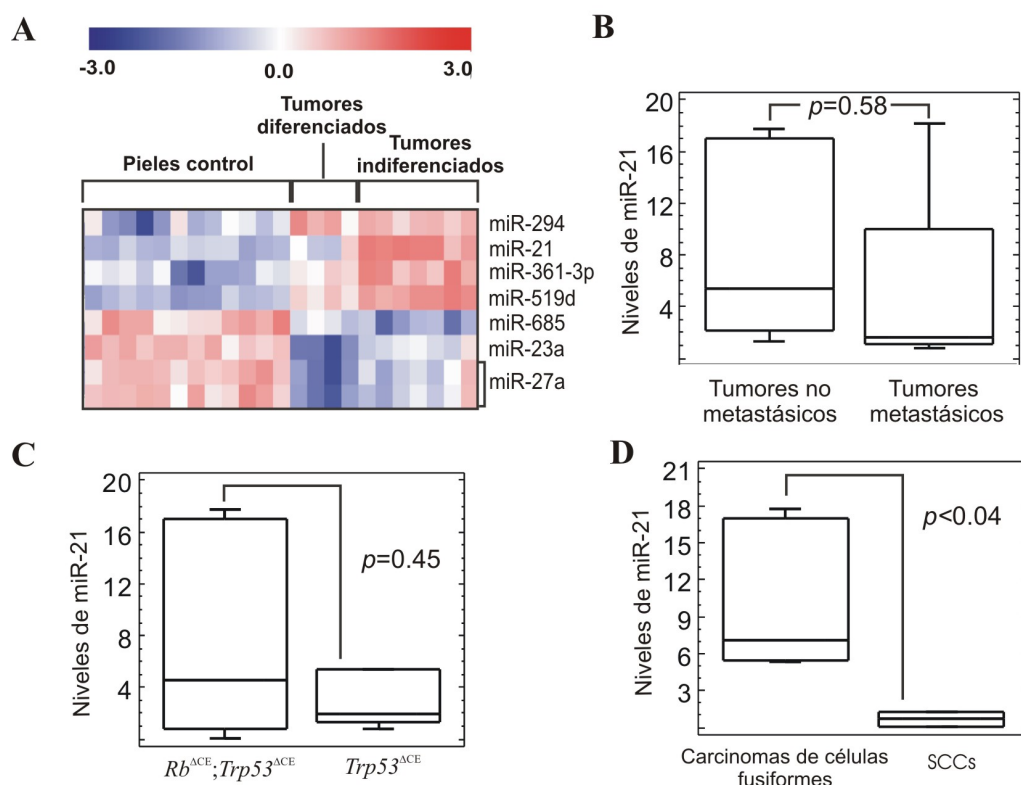


Figura 44. Sobreexpresión de miR-21 en tumores indiferenciados. A) Representación de microARNs que se expresan diferencialmente en tumores indiferenciados y diferenciados frente a pieles de ratones adultos control. Concretamente se observa la sobreexpresión de miR-21 en los tumores indiferenciados frente a los diferenciados. B, C y D) Análisis por qPCR de los niveles de expresión de miR-21 en 13 muestras tumorales de distinto grado de indiferenciación. Se analizaron las muestras agrupadas según sean metastásicas o no (B), provengan de animales $Trp53^{\Delta CE}$ o $Rb^{\Delta CE}; Trp53^{\Delta CE}$ (C), o correspondan a SCCs o a carcinomas de células fusiformes (D). p , valor estadístico de significancia por análisis de ANOVA (95% de confianza).

Al tener evidencias por medio de los análisis de biochips de la sobreexpresión de miR-21 en tumores indiferenciados, el siguiente paso es determinar si alguna de sus dianas moleculares está reprimida. Para ello realizamos análisis inmunohistoquímicos en tumores de animales $Trp53^{\Delta CE}$ y $Rb^{\Delta CE}; Trp53^{\Delta CE}$ donde observamos una disminución de los niveles de Sprouty-2 y PTEN en zonas indiferenciadas del tumor (fig. 45 A y B). Por otro lado, en estas zonas también se aprecia un aumento de P-Smad 2 (fig. 45 D) que, como efector de TGF- β (Massaous y Hata, 1997), nos indica la actividad de señalización de esta vía implicada en TEM. La inhibición en la expresión de *Sprouty* provoca una inducción de la actividad de ERK tal y como observamos con el aumento

de expresión nuclear de la forma fosforilada (fig. 45 C). Por medio de estudios bioquímicos por *western blot* a partir de extractos proteínicos de tumores de distinto grado de diferenciación, observamos que se produce un aumento de la actividad Akt en los tumores indiferenciados, detectable por el aumento en la expresión de P-Akt (fig. 45 F), lo que está en consonancia con la represión de PTEN por miR-21. También se corroboró por inmunohistoquímica este aumento de expresión de P-Akt en tumores indiferenciados (fig. 45 E). Estos resultados se observan en la misma medida tanto en tumores *Trp53^{ΔCE}* como en los *Rb^{ΔCE};Trp53^{ΔCE}*.

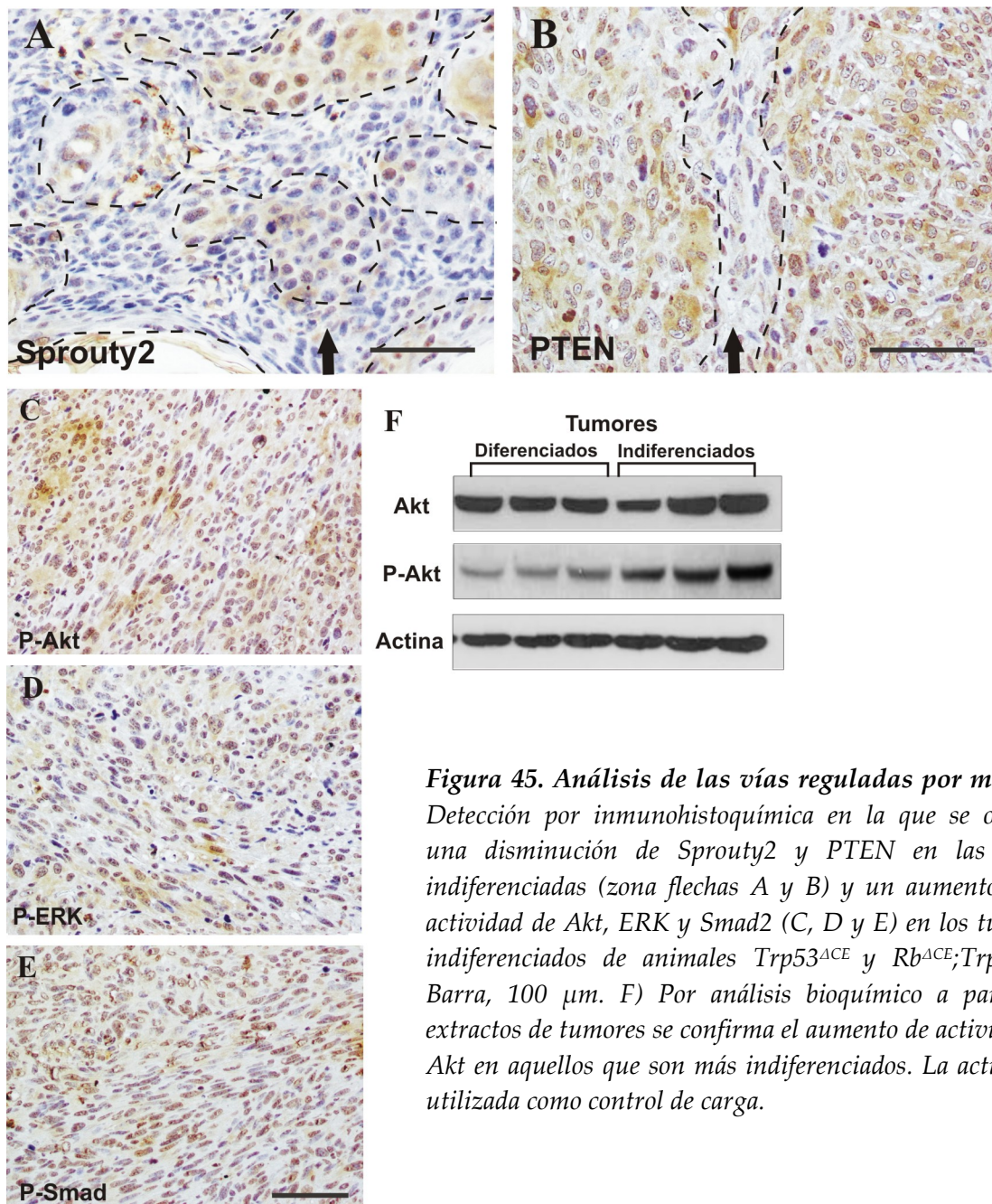


Figura 45. Análisis de las vías reguladas por miR-21. Detección por inmunohistoquímica en la que se observa una disminución de Sprouty2 y PTEN en las zonas indiferenciadas (zona flechas A y B) y un aumento de la actividad de Akt, ERK y Smad2 (C, D y E) en los tumores indiferenciados de animales *Trp53^{ΔCE}* y *Rb^{ΔCE};Trp53^{ΔCE}*. Barra, 100 μm. F) Por análisis bioquímico a partir de extractos de tumores se confirma el aumento de actividad de Akt en aquellos que son más indiferenciados. La actina fue utilizada como control de carga.

Discusión

1. *Rb* y *Tp53* en la supresión tumoral

La implicación de *Rb* y *Tp53* en la supresión tumoral se conoce en profundidad debido a su papel como reguladores de ciclo celular y apoptosis. El producto del gen *Rb*, pRb, inhibe la proliferación celular a través de su interacción con factores de transcripción E2F (Dyson, 1998; Nevins, 1998), siendo su inactivación necesaria para que se produzcan procesos de proliferación tanto en condiciones normales como patológicas, como es el caso del cáncer. El factor de transcripción p53, codificado por *Tp53*, se induce como respuesta al daño celular, hipoxia o activación oncogénica, promoviendo parada de ciclo celular, apoptosis, senescencia y reparación de ADN entre otros efectos (Vousden y Lu, 2002; Wahl y Carr, 2001). La interacción funcional que tiene lugar entre pRb y p53 en los procesos tumorigénicos en general, y en cáncer de piel en particular, está siendo estudiada a partir de las evidencias que indican una posible cooperación entre ambos en los procesos de supresión tumoral en determinados tejidos como son retina, cerebelo, pulmón, vejiga, próstata y hueso (Berman y col., 2008; Macpherson, 2008; Walkley y col., 2008). Además, se han descrito determinados modelos murinos deficientes en pRb en los que se inducen mecanismos apoptóticos dependientes de p53 en diversos tejidos (Macleod y col., 1996; Morgenbesser y col., 1994; Ruiz y col., 2005; Ruiz y col., 2006). A pesar de esto, aún se desconoce la implicación real de pRb y p53 en cáncer de piel y su interacción en su función como supresores tumorales en este tejido. Por este motivo, el objetivo principal del presente trabajo es el estudio de la cooperación funcional que se produce entre pRb y p53 en epidermis.

El cáncer de piel no melanoma es el tipo más común de cáncer que se desarrolla en humanos. Su incidencia es cada vez más alta debido, entre otras causas, al aumento de la media de edad de la población y a la excesiva exposición a radiaciones UV. Dos de las vías de señalización en las que se producen importantes cambios a nivel genético en los cánceres de piel no melanoma son las de pRb y p53. Se han encontrado mutaciones en el gen *Rb* en tumores humanos de tipo osteosarcoma, pulmón, próstata y mama (Bookstein y col., 1990; Harbour y col., 1988; Lee y col., 1988). Pero es más

frecuente que la práctica totalidad de los cánceres esporádicos humanos, entre ellos el cáncer de piel no melanoma, presente alteraciones en las vías de señalización relacionadas con la inactivación funcional de pRb. Por el contrario, aproximadamente un 50% de los cánceres humanos presenta mutaciones en el gen *Trp53* (Vogelstein y col., 2000). Concretamente, las mutaciones en *Trp53*, junto con las de H-ras, son las más frecuentes en cáncer de piel no melanoma (Caulin y col., 2007). Estos cambios contribuyen mayoritariamente al desarrollo en piel de carcinomas escamosos (SCCs). Los SCCs se caracterizan por sus propiedades agresivas y metastáticas, pero aún se desconocen las bases moleculares exactas que conducen a su malignización. Los SCCs son el tipo predominante de tumor en casos de cáncer de cérvix y de cabeza y cuello, mostrando una incidencia esporádica de aparición en cáncer de mama y pulmón. Además, existen estudios en pacientes que han sido sometidos a trasplante de órganos, en los que se observa que se produce un aumento de susceptibilidad a la aparición de SCC mediada por la infección por HPV. La tumorigénesis provocada por HPV está asociada a las oncoproteínas E6 y E7 que inactivan p53 y pRb respectivamente (Boukamp, 2005). Esta es otra de las evidencias de que la alteración de las vías de pRb y p53 conduce al desarrollo de SCCs. La identificación de las alteraciones que tienen lugar en estas vías de señalización permitirá la aplicación de posibles dianas terapéuticas dirigidas específicamente con el propósito de parar o remitir la progresión de este tipo de tumores. Consideramos por lo tanto importante estudiar en profundidad estos dos supresores tumorales, pRb y p53, y su implicación en la carcinogénesis epidérmica.

2. Fenotipo en epidermis de los animales *Trp53*^{ΔCE} y *Rb*^{ΔCE};*Trp53*^{ΔCE}

Los modelos murinos experimentales usados en el presente trabajo fueron generados mediante un sistema de recombinación específica de tejido Cre/LoxP, por el que se indujo la deficiencia en *Rb* y *Trp53* en epidermis. En estudios previos en nuestro laboratorio, (Ruiz y col., 2004), se observó que el fenotipo resultante de los animales

deficientes en pRb en epidermis ($Rb^{\Delta CE}$) se caracteriza por una hiperplasia e hiperqueratosis moderada, debidas a alteraciones en la proliferación y en la diferenciación (fig. 14 B, 15 B y 16 B). A pesar de estas alteraciones en epidermis, estos animales no desarrollan tumores espontáneos, posiblemente por el efecto compensatorio que pueden llevar a cabo otras proteínas de la familia de retinoblastoma (Lara y col., 2008b). Bajo tratamientos de carcinogénesis química se demostró que la ausencia de *Rb* en epidermis disminuye la incidencia tumoral, pero aumenta el grado de malignidad de los tumores producidos (Ruiz y col., 2005). Este fenómeno se debe a la inducción de apoptosis mediada por p53, lo que conduce a una presión selectiva que provoca una pérdida prematura de su función (Ruiz y col., 2005; Ruiz y col., 2006). Con estas evidencias resultaba de gran interés iniciar un estudio que permitiera analizar la posible cooperación funcional entre pRb y p53 en epidermis. Para ello, los modelos murinos $Trp53^{\Delta CE}$ y $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$ nos permitirían el estudio de la interferencia funcional entre ambos supresores tumorales específicamente en carcinogénesis epidérmica.

Los datos de la presente tesis demuestran que los animales $Trp53^{\Delta CE}$ no presentan alteraciones en proliferación ni en diferenciación en epidermis (fig. 14 C, 15 C y 16 C). El fenotipo en piel de los animales doble deficientes en pRb y p53 ($Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$) no presenta diferencias con respecto al que presentan los animales $Rb^{\Delta CE}$ en cuanto a marcadores de proliferación y diferenciación (fig. 14 D, 15 D y 16 D). Por tanto, la alteración del fenotipo en epidermis se debe a la ausencia de pRb y no de p53. Previamente, no se habían realizado estudios *in vivo* del fenotipo epidérmico en animales condicionales deficientes en p53 en epidermis. La generación de modelos condicionales deficientes en *Trp53* en epitelios se ha realizado en combinación con la deficiencia en otros genes implicados en tumorigénesis, como por ejemplo BRCA2 (Jonkers y col., 2001) o E-cadherina (Derksen y col., 2006), estudiándose en estos modelos el desarrollo espontáneo de tumores de mama, linfomas y SCCs. Nuestro modelo $Trp53^{\Delta CE}$, aunque no presenta alteraciones en el fenotipo epidérmico, muestra alteraciones displásicas tempranas en folículos pilosos, localización en la que se originarán los tumores en estos animales. Por otro lado, el modelo $Trp53^{\Delta CE}$, en

combinación con la ausencia de *Rb*, nos permite obtener un fenotipo epidérmico que hemos caracterizado, y en el que, aunque aparentemente no encontramos alteraciones en procesos de diferenciación con respecto a las que se producen en animales *Rb^{ACE}* (Ruiz y col., 2004), presenta un mayor aumento en los niveles de proliferación en folículos pilosos (fig. 27), lo que actuará, como veremos más adelante, como desencadenante de la aceleración del desarrollo tumoral en estos animales.

3. La deficiencia en p53 en epidermis conduce al desarrollo de tumores espontáneos

A pesar de que la ausencia de p53 en epidermis no conduce a alteraciones en el fenotipo epidérmico, los animales *Trp53^{ACE}* desarrollan tumores espontáneos en un 100% de los casos. Este hecho está en consonancia con la función supresora tumoral extensamente estudiada de p53 y con que más del 50% de cánceres humanos presentan mutaciones en *Trp53*. Además, se han descrito otros modelos animales *knock out* o condicionales para p53 con generación espontánea de tumores de distintos tipos (Attardi y Donehower, 2005; Derksen y col., 2006; Donehower y col., 1992; Jonkers y col., 2001) que muestran la importancia de la correcta funcionalidad de p53 en la supresión tumoral. Cabe destacar que las mutaciones en *Trp53* confieren efectos de ganancia de función. Por ejemplo, recientemente se han identificado nuevas funciones oncogénicas a partir de mutaciones en *Trp53* que inducen inestabilidad genética por inactivación de otros genes supresores tumorales como ATM (Xu, 2008). Este aspecto ha abierto una cierta controversia sobre el papel supresor que podrían ejercer las deleciones o mutaciones que conducen a la expresión de formas de p53 truncadas. En este sentido conviene señalar que, en un estudio comparativo empleando modelos *knock out* y *knock in*, se observa que en ausencia de estímulos oncogénicos (en este caso irradiación UV) ambas alteraciones confieren la misma susceptibilidad al desarrollo tumoral (Caulin y col., 2007; Wijnhoven y col., 2007). Por otro lado, la ganancia de función de las mutaciones parece ser que promueve un aumento de la inestabilidad cromosómica (Caulin y col., 2007; Xu, 2008). En este trabajo, hemos demostrado que la

pérdida completa de *Trp53* también conduce a una inestabilidad cromosómica prematura que se asocia con el desarrollo tumoral (resultados 2. 2. 3.). Finalmente, el estudio comparativo de la expresión génica entre tumores murinos y humanos nos permite identificar aquellas muestras tumorales humanas con mutaciones en *Trp53* (resultados 2. 8. 2.), lo que refuerza la similitud de este supresor tumoral en ambas situaciones de alteración génica. Nuestros datos, por tanto, no apoyan la hipótesis de la diferencia fundamental entre mutaciones con ganancia de función para *Trp53* postulada por otros autores (Caulin y col., 2007). Existen varias posibilidades que podrían explicar este efecto. Una de ellas es que este tipo de actividades sólo se produzcan en determinados tejidos, bajo determinados tipos de estímulos, o en el caso de que se analicen en sistemas no fisiológicos, como células en cultivo. Sin embargo, una de las más plausibles es que la frecuencia de mutaciones que conducen a formas inestables o truncadas de p53 en tumores humanos sea mayor de la estimada. En este sentido, una gran parte de los trabajos asumen que la detección inmunológica de p53 se asocia a formas mutantes, mientras que su no detección sería por la forma *wild type* debido a su corta vida media. A pesar de esto, se ha demostrado que una proporción muy importante de esos tumores en los que no se detecta la expresión de p53 presentan mutaciones que producen proteínas aberrantes y truncadas que funcionarían esencialmente como una pérdida total del gen (Holstege y col., 2009). En resumen, nuestros datos sugieren que los modelos murinos con alteraciones en *Trp53* en epidermis se convierten en una herramienta útil para el estudio de la malignización tumoral inducida por diferentes vías moleculares y nos pueden proporcionar datos esenciales para determinar las diferencias funcionales con mutaciones que puedan aportar posibles ganancias de función oncogénica.

Los tumores desarrollados en los animales *Trp53^{ACE}* son, casi en su totalidad, SCCs poco diferenciados y con características agresivas y metastásicas (fig. 24). Surgen como masas celulares a partir de displasias foliculares. La expresión de marcadores típicos de folículo piloso, como son K15 y K17, en lesiones premalignas, nos da una evidencia de que los tumores tienen su origen en las zonas foliculares (fig. 25).

Para profundizar en la posible causa del desarrollo tumoral en los animales *Trp53^{ACE}*, estudiamos tres de las actividades fisiológicas de p53 en epidermis: inducción de apoptosis en el proceso de catagén durante el ciclo del pelo (Botchkarev y Paus, 2003), inhibición de la respuesta inflamatoria mediada por NFκB (Komarova y col., 2005) y prevención de la amplificación alterada de centrosomas durante la mitosis y por tanto de la formación de mitosis aberrantes (Fukasawa y col., 1996; Meek, 2000).

La apoptosis es un mecanismo clave en el desarrollo normal del folículo piloso, ya que favorece el proceso de regresión folicular tras el crecimiento del pelo (Botchkarev y col., 2001). Nuestros resultados descartan que los posibles defectos en el ciclo del pelo causados por la ausencia de p53 en la epidermis de los animales *Trp53^{ACE}* sean desencadenantes del proceso tumoral. No se observan cambios histológicos evidentes entre epidermis de animales *Trp53^{ACE}* y epidermis control tras someterlos a estímulos de recrecimiento de pelo por depilación. Tampoco se produce desarrollo tumoral en la zona depilada de los animales *Trp53^{ACE}* a largo plazo. Estos resultados pueden deberse a que la ausencia de p53 localizada en epidermis no pueda, por sí sola, ser la desencadenante de alteraciones en el ciclo del pelo, siendo necesario que se produzca algún tipo de estímulo en la dermis. Ciertos estudios muestran evidencias de que durante el proceso de crecimiento del pelo (fase de anagén), los fibroblastos de la papila dérmica segregan una serie de factores de crecimiento que mantienen la proliferación y la diferenciación de los queratinocitos del folículo (Hibberts y col., 1996; Shimaoka y col., 1994). Por el contrario, en catagén, se inhibe la secreción de estos factores. Mayoritariamente, los estudios de los procesos de apoptosis que se inducen durante la fase de catagén, se han desarrollado en modelos con pérdida completa de p53 (Botchkarev y col., 2001). Es posible que la pérdida condicional de p53 en epidermis no provoque todos los efectos necesarios en la dermis para que las alteraciones en el ciclo del pelo puedan desencadenar un proceso tumorigénico. También es posible, que otras moléculas como son Bcl2, Fas y Bax, implicadas en la regulación de la apoptosis responsable de la regresión de los folículos en anagén (Lindner y col., 1997), actúen de forma independiente a p53. Esto podría ser una

explicación de que no se produzcan alteraciones en el ciclo del pelo de los animales *Trp53^{ACE}* por la mera ausencia de p53.

Con respecto a la inflamación, es de importancia considerar que los procesos crónicos de inflamación están asociados al desarrollo de tumores (Kundu y Surh, 2008; Mantovani y col., 2008), por lo que una regulación negativa de la inflamación puede actuar como supresor de la progresión tumoral. La señalización mediada por la familia NFκB en la inflamación ha sido ampliamente estudiada (Karin y col., 2002) y recientemente se ha descrito que p53 es un inhibidor de la inflamación que actúa como antagonista de NFκB, inhibiendo la transcripción de promotores dependientes de este factor nuclear (Komarova y col., 2005). En nuestros estudios, los análisis inmunohistológicos y bioquímicos confirman la alteración de los mecanismos implicados en esta vía y el aumento de células de repuesta inflamatoria en la piel de los animales *Trp53^{ACE}* y *Rb^{ACE};Trp53^{ACE}* (fig. 18 y 19). Aunque los análisis se realizaron a partir de pieles sin lesión de animales adultos, no se descartó que el aumento en la señal inflamatoria pudiera deberse a un proceso tumorigénico no detectado. Por ese motivo, se realizaron análisis de biochips a partir de pieles de recién nacido, donde también se encontraron evidencias de aumento en la expresión de genes implicados en procesos inflamatorios (fig. 20). Estos datos sugieren que se produce un proceso proinflamatorio previo al desarrollo tumoral.

Cabría investigar más a fondo acerca de si el aumento de los procesos inflamatorios que tiene lugar en nuestros modelos, viene inducido por los niveles de citoquinas secretadas por los queratinocitos, o bien son resultado de la movilización de células inflamatorias a nivel de dermis por procesos de autoinmunidad. En este sentido, no parece probable que se produzca un proceso autoinmune en los modelos animales de estudio ya que no hay evidencias de estos procesos en folículos y glándulas de los animales. Por lo tanto, el reclutamiento de células inflamatorias en la dermis de los animales puede deberse a la secreción de citoquinas por parte de los queratinocitos de la epidermis. Los queratinocitos secretan determinadas citoquinas que incluyen interleuquinas, factores de crecimiento y quimioquinas que pueden desencadenar procesos inflamatorios en piel (Tokura y col., 2008; Uchi y col., 2000). Pero, como

hemos comentado anteriormente, también es posible que el reclutamiento inflamatorio se deba en parte a que al desencadenarse el proceso tumorigénico aumente el nivel de citoquinas en sangre (Bauluz y col., 1994). Sería de interés realizar un estudio comparativo del nivel de determinadas citoquinas inflamatorias en sobrenadantes celulares a partir de cultivos primarios de queratinocitos, y en suero sanguíneo de los animales con tumores, para comprobar que se produce una secreción de citoquinas por parte de los queratinocitos aislados y que, por tanto, el proceso inflamatorio sea el desencadenante del posterior desarrollo tumoral. Otro aspecto que sería interesante analizar es cómo responden los animales *Trp53^{ACE}* a procesos inflamatorios provocados ante determinados estímulos, como pueden ser la aplicación de TPA (Hvid y col., 2008), observando si presentan sobreactivación o aceleración en el desarrollo tumoral.

La implicación de p53 en la prevención de amplificaciones centrosómicas y formación de mitosis aberrantes sugiere que la ausencia de p53 en los modelos condicionales de estudio pueda provocar defectos mitóticos. La inestabilidad cromosómica ha sido ampliamente estudiada en el desarrollo de SCCs (Aldaz y col., 1988; Slaga y col., 1986). Además, las aberraciones mitóticas provocadas por mutaciones en p53, inducen el desarrollo tumoral, tal y como se ha descrito en profundidad en diferentes modelos animales (Caulin y col., 2007; Wang y col., 1998).

Nuestros resultados demuestran que se produce un aumento en la proporción de mitosis aberrantes en la epidermis *Trp53^{ACE}* y *Rb^{ACE};Trp53^{ACE}* (fig. 21), lo que puede contribuir al desarrollo tumoral que tiene lugar en ausencia de p53. Concretamente, se produce un mayor aumento de mitosis en los folículos pilosos (fig. 22 A), lo que está en consonancia con que los tumores tengan su origen en esta localización. El porcentaje de mitosis aberrantes en los folículos pilosos de animales *Rb^{ACE};Trp53^{ACE}* es mayor, debido a los altos niveles de proliferación que se producen. Esto podría ser una explicación de la aceleración en la aparición tumoral que se produce en los animales *Rb^{ACE};Trp53^{ACE}* con respecto a los animales *Trp53^{ACE}*.

Observamos además, que bajo protocolos de carcinogénesis química en animales *Rb^{ACE}*, la malignización tumoral debida a la pérdida de p53, se debe, en parte, a mitosis aberrantes (fig. 22 B). Los resultados sugieren que p53 controla el desarrollo

tumoral a través del mantenimiento mitótico, lo que está en consonancia con estudios previos en tumores murinos obtenidos a partir de carcinogénesis química (Wang y col., 1998).

Las alteraciones que se observan en el número de centrosomas en epidermis y tumores (fig. 23 A, A', B y C) sugieren que la inestabilidad cromosómica, y la formación de mitosis aberrantes, se deben a una amplificación centrosómica alterada inducida por la ausencia de p53 (Fukasawa y col., 1996). Este hecho está en consonancia con numerosos estudios realizados a partir de sistemas *in vivo* o *in vitro* con mutaciones o con pérdida condicional de *Trp53* o de otros genes asociados a carcinogénesis (D'Assoro y col., 2008; Weaver y col., 2002). La amplificación centrosómica está asociada con alteraciones en proteínas del control mitótico. En nuestro estudio nos centramos en estudiar la implicación de Chk1 y Chk2 en la formación de mitosis aberrantes, observando un aumento de la actividad de estas proteínas en los tumores deficientes en p53 (fig 23 D y D'). Además, mediante estudios genómicos a partir de las muestras tumorales, encontramos un aumento en la expresión de genes relacionados con control mitótico. En adelante sería de interés comprobar los niveles de expresión y el grado de actividad de otras proteínas que actúan como punto de control mitótico. Concretamente, se ha descrito que la pérdida de p53 provoca una activación de Aurora-A (D'Assoro y col., 2008; Yang y col., 2006), así como defectos en la expresión de BubR1, lo que conduce a una amplificación en el número de centrosomas (Oikawa y col., 2005). Estos modelos serían idóneos para evaluar la efectividad de drogas dirigidas específicamente contra esas proteínas.

4. Cooperación funcional entre pRb y p53 en la tumorigénesis epidérmica

Los animales *Rb^{ACE};Trp53^{ACE}*, al igual que los *Trp53^{ACE}*, desarrollan tumores epidérmicos espontáneos, pero estos alcanzan mayor tamaño, comienzan a desarrollarse a edades más tempranas y presentan una mayor incidencia de aparición en los animales (fig. 17 y 28). Por tanto, la deficiencia en pRb en epidermis en ausencia

de p53, acelera el desarrollo tumoral y aumenta la susceptibilidad tumorigénica. Los tumores en ambos modelos tienen el mismo origen, localización y poseen las mismas características una vez desarrollados, presentando el mismo patrón de expresión de marcadores epiteliales (fig. 24). Además, evolucionan de la misma manera a carcinomas cada vez más indiferenciados y agresivos, no encontrándose diferencias significativas entre la proporción de tumores fusiformes originados en uno y otro genotipo (fig. 37). Según estas similitudes podemos afirmar que la ausencia de p53 es la que determina el desarrollo tumoral y que la doble deficiencia en pRb y p53 acelera su aparición y provoca el aumento de su crecimiento e incidencia. Parece clara, por tanto, la cooperación funcional entre pRb y p53 en los procesos de supresión tumoral, siendo necesaria sólo la presencia de uno de los alelos de *Rb* para evitar la aceleración en el desarrollo tumoral en ausencia de p53.

Nuestros datos sugieren que se produce una cooperación entre pRb y p53 en la supresión del desarrollo tumoral, tal y como se ha descrito en otros modelos animales (Berman y col., 2008; Harvey y col., 1995; Laurie y col., 2006; Walkley y col., 2008). El siguiente paso es intentar determinar los mecanismos que provocan la aceleración del desarrollo tumoral en animales *Rb^{ΔCE};Trp53^{ΔCE}* con respecto a los animales *Trp53^{ΔCE}*.

En primer lugar, la apoptosis es un mecanismo esencial de supresión tumoral y de regulación del ciclo celular mediado por p53 que ha sido estudiado en profundidad en cáncer de piel (Eberle y col., 2007; Erb y col., 2008; Raj y col., 2006). Por tanto, una de nuestras primeras aproximaciones fue analizar el grado de apoptosis de los tumores desarrollados en nuestros modelos animales. El número de células apoptóticas en los tumores de los modelos *Trp53^{ΔCE}* y *Rb^{ΔCE};Trp53^{ΔCE}* no muestra diferencias entre ambos, por lo que parece que la aceleración tumoral, en el caso de los doble deficientes, no se debe en principio a alteraciones en los niveles de apoptosis (fig. 26). Estos resultados reforzarían el papel principal de p53 como inductor de apoptosis en epidermis y en tumores epidérmicos.

En cuanto a los estudios de proliferación, sólo se encuentran diferencias en los folículos pilosos, donde la tasa de proliferación es mayor en los animales *Rb^{ΔCE};Trp53^{ΔCE}*. Sin embargo, la proliferación en estados avanzados de los tumores no

muestra diferencias significativas entre ambos modelos. El aumento de la susceptibilidad tumoral que ocurre en los animales doble deficientes podría deberse a un aumento en los niveles de proliferación en los folículos pilosos, lo que está en consonancia con el aumento en el número de mitosis que se produce previo al desarrollo tumoral en los folículos de estos animales. Las funciones de p53 como regulador de la proliferación, en relación al mantenimiento adecuado de la progresión mitótica, han sido ampliamente descritas (Fukasawa, 2005; Tarapore y Fukasawa, 2000; Tomasini y col., 2008). Pero aún no están claros los mecanismos de cooperación entre pRb y p53 en la regulación de la proliferación celular. De acuerdo a nuestros resultados, observamos que la ausencia de p53 es la que favorece la formación de mitosis aberrantes, que conducen al desarrollo tumoral. La ausencia de pRb es la que aumenta los niveles de proliferación, y por tanto de mitosis. Por este motivo, la doble ausencia de pRb y p53 aumenta los niveles de mitosis aberrantes, lo que favorece que aumente la susceptibilidad tumoral en los animales $Rb^{ACE};Trp53^{ACE}$, y por tanto, que se acelere el proceso tumorigénico.

En los procesos tumorigénicos se produce la activación anómala de determinadas vías que modulan la progresión del ciclo celular. Las vías de señalización de PI3K y de Ras/MEK/ERK, se activan por determinados factores mitogénicos que actúan a través de diferentes receptores, como por ejemplo EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico), y estimulan proliferación, crecimiento y supervivencia celular. Estudios previos en nuestro laboratorio (Segrelles y col., 2002 y 2006) han demostrado que las vías dependientes de PI3K y de Ras/MEK/ERK, son fundamentales en la carcinogénesis epidérmica de ratón. La activación de estas vías incrementa la actividad de determinadas quinasas, como por ejemplo Akt y ERK. Este es el principal motivo por el que nos interesamos en el estudio de la activación de Akt y ERK en nuestros modelos, intentando determinar si la activación se produce en estados pretumorales o bien ocurre como consecuencia del proceso tumoral. Con los datos obtenidos observamos que el aumento de la actividad de Akt se produce desde estados previos al desarrollo tumoral en los animales $Rb^{ACE};Trp53^{ACE}$, mientras que la activación de ERK tiene lugar como consecuencia de la progresión tumoral (fig. 29 A y 30 A). La

falta de activación de ERK en estados pretumorales puede deberse al aumento de la expresión de *Sprouty2* que actúa como inhibidor de esta vía (fig. 30 A). El aumento de la actividad de Akt en los animales $Rb^{ACE}Trp53^{ACE}$ podría estar en consonancia con el prematuro aumento proliferativo que ocurre en los folículos pilosos que conduce a la aceleración del desarrollo tumoral.

Resultados previos de nuestro laboratorio (Segrelles y col., 2004), demostraron que la vía PI3K/PTEN/Akt juega un papel importante en el desarrollo de procesos angiogénicos debido a la regulación de la expresión postranscripcional de VEGF (factor de crecimiento de las células endoteliales). La angiogénesis es el proceso por el que se forman nuevos vasos capilares a partir de vasos sanguíneos ya existentes. En los procesos tumorales las propias células malignas envían una serie de señales que activan la formación de nuevos vasos necesarios para la posterior migración e invasión de las células tumorales a otras regiones del organismo. Al tener evidencias del aumento de actividad Akt en los tumores $Rb^{ACE};Trp53^{ACE}$ con respecto a los tumores $Trp53^{ACE}$, estudiar la angiogénesis que tiene lugar en los tumores de nuestros modelos es un abordaje interesante con el que intentar explicar la causa del mayor crecimiento que tiene lugar en los tumores $Rb^{ACE};Trp53^{ACE}$. Hemos analizado por inmunofluorescencia la expresión en los tumores de CD31, marcador de células endoteliales propias de los vasos sanguíneos, observando un aumento cuantitativo de angiogénesis en los tumores $Rb^{ACE};Trp53^{ACE}$ con respecto a los $Trp53^{ACE}$ (fig 31 y 32). Observamos por tanto que la doble deficiencia en pRb y p53 favorece la formación de nuevos vasos sanguíneos y el consecuente progreso tumoral en mayor grado que la deficiencia en p53.

5. Los tumores murinos presentan características de expresión génica similares a tumores humanos malignos

Los tumores desarrollados por los modelos animales $Trp53^{ACE}$ y $Rb^{ACE};Trp53^{ACE}$ sufren procesos de TEM y metastasis que los pueden asemejar a cánceres humanos malignos. Debido a la importancia de la correcta funcionalidad de p53 en la supresión

tumoral, y el hecho de que aproximadamente un 50% de cánceres humanos presenten mutaciones en *Trp53*, nos planteamos la posibilidad de que los tumores murinos desarrollados a partir de los modelos condicionales deficientes en *Trp53* puedan ser comparados con cánceres humanos malignos y ser utilizados a nivel génico como una herramienta útil para el diagnóstico de cánceres humanos.

Estudios genómicos anteriores realizados entre dos especies diferentes han permitido mostrar alteraciones comunes asociadas a procesos tumorales (Hodgson y col., 2001; Maser y col., 2007), obtener firmas moleculares asociadas a mutaciones en determinados genes (Maser y col., 2007) e identificar la presencia de nuevos oncogenes en cánceres humanos (Zender y col., 2006). Concretamente, para nuestro estudio hemos comparado los tumores de ratón con cánceres humanos con mutaciones en *Trp53* o con un alto grado de malignidad, y con firmas génicas de células madre humanas.

Como resultado de estas comparaciones, observamos que los análisis de expresión génica de los tumores murinos deficientes en p53 presentan una gran similitud con los perfiles génicos de cánceres humanos con mutaciones en *Trp53*. Se produce un alto grado de solapamiento entre los genes murinos sobreexpresados con genes propios de cánceres humanos de tipo epitelial y hematológico, como son cáncer de mama, vejiga, endometrio y linfomas. Además, los genes sobreexpresados en los tumores murinos se sobreexpresan también en diversos tumores humanos epiteliales o hematológicos de alto grado de malignidad (fig. 36).

Con respecto a la comparativa con firmas de células madre humanas se observó que los tumores murinos presentan patrones de expresión propios de células madre humanas (tabla 2), lo que puede estar en consonancia con las evidencias que existen del origen folicular de los tumores. Posiblemente, la ausencia de p53 en epidermis provoca una alteración en genes de las células madre foliculares que desemboca en un proceso carcinogénico. La alteración en las células madre en procesos tumorigénicos en piel está ampliamente descrita (Kamstrup y col., 2008; Lorz y col., 2009; Zouboulis y col., 2008). Además, la deficiencia en Rb y p53 en precursores de osteoblastos, induce el desarrollo de osteosarcomas metastásicos que se caracterizan por una alta expresión de *Sca-1*, marcador asociado a células madre (Berman y col., 2008). Nuestros resultados,

junto con las evidencias del origen folicular de los tumores y la sobreexpresión del marcador de células madre K15 en lesiones premalignas, parecen demostrar que se produce una alteración a nivel de las células madre foliculares que conduce a un incremento proliferativo y a un aumento de mitosis aberrantes, lo que desencadena un proceso tumoral en el folículo piloso.

6. Los tumores murinos sufren procesos de TEM y metástasis por medio de mecanismos mediados por microARNs

La metástasis, proceso por el que el cáncer se propaga desde su lugar de origen a otras localizaciones, es la responsable de la mayoría de las muertes causadas por cáncer. En cánceres epiteliales, la malignización e invasión tumoral que conduce a metástasis se inicia mediante el proceso de TEM, que da lugar a la pérdida de las características epiteliales y a la adquisición de propiedades mesenquimales en las células. El conocimiento de las vías moleculares implicadas en este fenómeno es de vital importancia para el desarrollo de posibles dianas terapéuticas que frenen la malignización del cáncer y por tanto el desarrollo de metástasis.

Nuestros datos sobre TEM se basan en un estudio de expresión de genes que caracterizan a las células que han sufrido el proceso de transición, y de los genes moduladores de este proceso como son *Snai1*, *Twist1*, *FoxC2* y *Zeb 1 y 2* (fig. 39). Caracterizamos, en los estados más avanzados de los tumores de los animales *Trp53^{ACE}* y *Rb^{ACE};Trp53^{ACE}*, la pérdida de marcadores epiteliales y la expresión de marcadores propios de células mesenquimales. Cabe destacar que observamos un aumento en la expresión de la citoquina TGF- β y de alguno de sus receptores y efectores (factores Smad) en tumores indiferenciados. La implicación de la vía de señalización TGF- β en malignización tumoral y metástasis está ampliamente descrita (Li y col., 2006; Padua y Massague, 2009). TGF- β presenta una acción dual en la epidermis. A pesar de que en epidermis normal y en estados tempranos tumorales esta vía tiene un efecto supresor, la inducción de la señalización de la misma favorece su activación en los estados más

avanzados de los tumores favoreciéndose así la malignización y la progresión tumoral (Massague, 2008; Seoane, 2008). Por la dualidad de su acción, la señalización mediada por TGF- β es uno de los mecanismos moleculares más estudiados en cánceres humanos, pudiéndose convertir en una excelente diana terapéutica frente a esta patología. La vía de señalización de TGF- β está implicada de forma directa en procesos de TEM y TME. TGF- β regula la plasticidad celular por medio de la acción de BMPs, factores Smad, y activación de otras vías de señalización como son Ras/MAPK, PI3K/Akt, Wnt y Notch (Moustakas y Heldin, 2007; Xu y col., 2009). Nuestros datos podrían confirmar que la inducción de TEM se debe en parte a una señalización incrementada de la vía de TGF- β .

Los microARNs son moléculas encargadas, entre multitud de otros procesos, de reprimir la acción de determinadas dianas moleculares favoreciendo la iniciación y la progresión de la malignización tumoral. De forma directa, se conoce la acción de p53 sobre la regulación de determinados microARNs (Hermeking, 2007; Raver-Shapira y Oren, 2007). Estas moléculas están además altamente implicadas en procesos de TEM y metástasis (Gregory y col., 2008; Ma y Weinberg, 2008; Tavazoie y col., 2008). Para analizar el estado general de los microARNs en los tumores desarrollados en los modelos murinos se realizaron análisis de biochips de microARNs a partir de muestras tumorales. Se encontró expresión diferencial de variedad de microARNs implicados en procesos de control de la homeostasis epidérmica y en malignidad tumoral (fig. 43), lo que nos hizo considerar a estas moléculas como candidatas en los procesos de TEM y metástasis que se producen en los tumores desarrollados en los animales *Trp53^{ACE}* y *Rb^{ACE};Trp53^{ACE}*. Concretamente, nos centramos en un microARN, el miR-21, ya que obtuvimos evidencias de su sobreexpresión en las formas más indiferenciadas de los tumores, lo que puede significar que sea una de las moléculas responsables de forma directa del proceso de TEM que tiene lugar en los tumores. miR-21 está ampliamente descrito como uno de los microARNs altamente sobreexpresados en tumores sólidos de distinta naturaleza, como son glioblastoma y mama (Ma y Weinberg, 2008). Además, la represión de las dianas moleculares sobre las que actúa miR-21 permite la activación de vías de señalización como son PI3K/Akt y MAPK/ERK (fig. 44) (Sayed y col., 2008;

Talotta y col., 2009; Thum y col., 2008). Recordemos que, en los estudios de la cooperación funcional entre pRb y p53 observamos que la inducción de la vía de PI3K/Akt se produce previa al desarrollo tumoral en los animales *Rb^{ΔCE};Trp53^{ΔCE}*, siendo una de las causas del aumento de la susceptibilidad tumorigénica en estos animales. La actividad de la vía de señalización PI3K/Akt y el inicio de la actividad MAPK que se produce en los estados más avanzados de los tumores de animales *Trp53^{ΔCE}* y *Rb^{ΔCE};Trp53^{ΔCE}* se debe posiblemente a que la desregulación de microARNs, como es el miR-21, induce de forma directa la actividad de estas vías, favoreciendo los procesos de TEM y la progresión maligna.

La expresión de miR-21 se induce por acción directa de componentes de las vías de señalización de TGF- β , factores AP-1 (c-Fos y c-Jun) y Stat3 sobre sitios de unión de su promotor (Loffler y col., 2007; Qian y col., 2008; Talotta y col., 2009). De esta forma, miR-21 se expresa por la inducción de AP-1 en respuesta a H-ras, lo que hace que se produzca una autorregulación: por una parte se activan vías debido a la represión que ejerce miR-21 sobre determinadas dianas supresoras; por otra parte se induce la expresión de miR-21 como resultado de la activación de estas vías (Talotta y col., 2009). La inducción de la expresión de miR-21 por acción de TGF- β está en consonancia con los datos obtenidos por análisis de biochips y de inmunohistoquímica (fig. 39 y 45), donde observamos que se produce una activación de miembros de esta vía de señalización en las formas más indiferenciadas de los tumores. De esta forma, el aumento de la señalización de TGF- β permite el aumento de expresión de miR-21 favoreciendo por tanto la plasticidad epitelial, procesos de TEM y posiblemente inducción final de metástasis en los tumores de nuestros modelos animales, tal y como ocurre en otros estudios de cánceres humanos (Qian y col., 2008; Zavadil y col., 2007). El factor de transcripción Stat3 está implicado en procesos inflamatorios mediados por acción de ciertas interleuquinas. La inflamación, por tanto, podría favorecer en cierto modo la inducción de miR-21 contribuyendo a su vez al potencial oncogénico de Stat3 (Loffler y col., 2007).

7. Aplicación terapéutica de los modelos murinos $Trp53^{ACE}$ y $Rb^{ACE};Trp53^{ACE}$

El fin último es que, en un futuro, los modelos animales estudiados, y las vías moleculares que conducen al desarrollo tumoral y a la progresión maligna, puedan servir como herramienta terapéutica para validar el uso de determinados inhibidores farmacológicos que bloqueen el desarrollo y la malignización tumoral en ensayos preclínicos.

Gracias a los datos obtenidos que evidencian la implicación de determinadas vías moleculares en el desarrollo tumoral de los modelos de estudio, sería interesante llevar a cabo distintas aproximaciones terapéuticas sobre los tumores desarrollados en los animales $Trp53^{ACE}$ y $Rb^{ACE};Trp53^{ACE}$. Al producirse alteraciones en procesos inflamatorios, en angiogénesis y en las vías de señalización PI3K/Akt y Ras/MEK/ERK, podrían llevarse a cabo tratamientos con antiinflamatorios e inmunosupresores con propiedades antiproliferativas, tales como ácido acetil salicílico, inhibidores de EGFR, mitramicina y rapamicina. Haciendo uso de imágenes por PET (tomografía por emisión de positrones) se evaluarían los efectos de estos tratamientos sobre el tumor, analizando la posible detención o remisión del desarrollo tumoral con respecto a animales control no tratados.

La similitud génica que encontramos entre los tumores murinos con diversos cánceres humanos podría posibilitar que estos modelos animales puedan ser utilizados como herramienta en ensayos preclínicos de terapias antitumorales, usando como diana terapéutica vías de señalización o productos génicos específicos. Debido a las características invasivas de los tumores de nuestros modelos animales las posibles terapias utilizadas podrían estar dirigidas a inhibir la malignización tumoral. Las terapias utilizadas pueden usarse de forma directa frente a genes implicados en el mantenimiento del fenotipo de “célula madre” de las células transformadas. De esta forma la eficacia del tratamiento podría ser muy alta debido a que las células madre tumorales pueden ser las responsables en cierta manera de la propagación y progresión tumoral.

Además, el hecho de que miR-21 pueda ser considerado un microARN clave en la modulación de procesos de TEM que conducen a la malignización tumoral y a la metástasis, nos hace plantearnos su utilización como diana terapéutica para el freno de la progresión del cáncer desarrollado en estos modelos animales. Si de esta manera fuera posible frenar el desarrollo tumoral en los ratones, sería de interés considerarlo en un futuro como diana terapéutica en cánceres humanos. En la actualidad se están desarrollando determinadas herramientas que conducen al bloqueo directo de microARNs específicos. En este sentido están diseñados los denominados “antagomirs”, pequeños oligonucleótidos sintéticos complementarios a un microARN concreto al que se unen bloqueando su actividad (Mattes y col., 2007). Recientemente se han empleado “antagomirs” para el bloqueo concreto de miR-21 en un modelo murino con hipertensión. En fibroblastos de tejido cardíaco, miR-21 actúa como inductor de ERK/MAPK. La acción del antagomir sobre miR-21 en el modelo *in vivo* permitió la reducción de la actividad de la vía de ERK/MAPK atenuando la alteración cardíaca de los animales (Thum y col., 2008). Además de los “antagomirs”, comienzan a emplearse los denominados “miRNA sponges”. Corresponden a transcritos largos con promotores de expresión fuertes, que poseen multitud de sitios de unión en *tandem* a uno o a varios microARNs. De esta forma pueden llegar a bloquear a toda una familia de microARNs (Ebert y col., 2007). Los vectores que codifican estos transcritos pueden ser transfectados a células donde reprimen a los microARNs diana de una forma más eficiente que los oligonucleótidos sintéticos. En la actualidad se están desarrollando nuevos vectores que permitan la expresión estable de estos transcritos en modelos animales de determinadas enfermedades.

Conclusiones

1.- La pérdida de p53 en epidermis de ratón no produce alteraciones en los procesos de diferenciación y proliferación epidérmicos. Por otro lado, las alteraciones producidas por la pérdida de pRb (hiperplasia e hiperqueratosis moderadas asociadas a defectos en la diferenciación y aumento de la proliferación) no se ven agravadas por la pérdida de p53.

2.- La ausencia de p53, y no de pRb, es la que determina la aparición de tumores epidérmicos, lo que confirma su carácter de supresor tumoral esencial en este tejido. No obstante, la deficiencia en pRb en ausencia de p53 provoca un aumento de la susceptibilidad tumorigénica.

3.- La ausencia de p53 confiere susceptibilidad al desarrollo tumoral asociado a procesos inflamatorios y a defectos en el mantenimiento mitótico previos a la aparición de tumores.

4.- La aceleración en el desarrollo tumoral en los animales $Rb^{ACE};Trp53^{ACE}$ se debe a un incremento en la proliferación en folículos pilosos, y por tanto de mitosis aberrantes, lo que conduce a una formación temprana de displasias foliculares con una posible implicación de la población de células madre de este tejido.

5.- El aumento en el crecimiento tumoral y en la susceptibilidad tumorigénica en los animales $Rb^{ACE};Trp53^{ACE}$ se debe a mecanismos de cooperación funcional que provocan un incremento temprano en la actividad de Akt favoreciéndose así la formación de nuevos vasos sanguíneos.

6.- Los patrones de expresión génica detectados en los tumores de los ratones $Trp53^{ACE}$ y $Rb^{ACE};Trp53^{ACE}$ son muy parecidos a los encontrados en tumores humanos, de diverso origen, con mutaciones en $Tp53$ y/o comportamiento agresivo, presentando además un enriquecimiento en genes de células madre humanas.

7.- Los tumores primarios de los animales $Trp53^{\Delta CE}$ y $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$ sufren procesos de TEM que desembocan, frecuentemente, en la formación de focos metastásicos en pulmón.

8.- La expresión alterada de diversos microARNs, y en particular la sobreexpresión de miR-21 en tumores indiferenciados, puede estar implicada en procesos de TEM y metástasis.

Bibliografía

- Aberdam, D., Candi, E., Knight, R.A. y Melino, G. (2008) miRNAs, 'stemness' and skin. *Trends Biochem Sci* 33, 583-91.
- Aggarwal, B.B. (2004) Nuclear factor-kappaB: the enemy within. *Cancer Cell* 6, 203-8.
- Alam, M. y Ratner, D. (2001) Cutaneous squamous-cell carcinoma. *N Engl J Med* 344, 975-83.
- Aldaz, C.M., Conti, C.J., Larcher, F., Trono, D., Roop, D.R., Chesner, J., Whitehead, T. y Slaga, T.J. (1988) Sequential development of aneuploidy, keratin modifications, and gamma-glutamyltransferase expression in mouse skin papillomas. *Cancer Res* 48, 3253-7.
- Alonso, L. y Fuchs, E. (2003) Stem cells of the skin epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 Suppl 1, 11830-5.
- Ansieau, S., Bastid, J., Doreau, A., Morel, A.P., Bouchet, B.P., Thomas, C., Fauvet, F., Puisieux, I., Doglioni, C., Piccinin, S., Maestro, R., Voeltzel, T., Selmi, A., Valsesia-Wittmann, S., Caron de Fromental, C. y Puisieux, A. (2008) Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence. *Cancer Cell* 14, 79-89.
- Attardi, L.D. y Donehower, L.A. (2005) Probing p53 biological functions through the use of genetically engineered mouse models. *Mutat Res* 576, 4-21.
- Bailleul, B., Surani, M.A., White, S., Barton, S.C., Brown, K., Blessing, M., Jorcano, J. y Balmain, A. (1990) Skin hyperkeratosis and papilloma formation in transgenic mice expressing a ras oncogene from a suprabasal keratin promoter. *Cell* 62, 697-708.
- Bartek, J. y Lukas, J. (2003) Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell* 3, 421-9.
- Bauluz, C., Larcher, F., Ballestin, C., Grande, T. y Jorcano, J.L. (1994) Augmented expression of cytokines in mouse epidermal tumor cells and its possible involvement in the induction of hematopoietic alterations. *Mol Carcinog* 11, 155-63.
- Ben-Porath, I., Thomson, M.W., Carey, V.J., Ge, R., Bell, G.W., Regev, A. y Weinberg, R.A. (2008) An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat Genet* 40, 499-507.
- Benitah, S.A. (2007) Epidermal stem cells in skin homeostasis and cutaneous carcinomas. *Clin Transl Oncol* 9, 760-6.
- Bensaad, K., Tsuruta, A., Selak, M.A., Vidal, M.N., Nakano, K., Bartrons, R., Gottlieb, E. y Vousden, K.H. (2006) TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell* 126, 107-20.

- Berman, S.D., Calo, E., Landman, A.S., Danielian, P.S., Miller, E.S., West, J.C., Forhoue, B.D., Caron, A., Bronson, R., Bouxsein, M.L., Mukherjee, S. y Lees, J.A. (2008) Metastatic osteosarcoma induced by inactivation of Rb and p53 in the osteoblast lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 11851-6.
- Bjerkvig, R., Tysnes, B.B., Aboody, K.S., Najbauer, J. y Terzis, A.J. (2005) Opinion: the origin of the cancer stem cell: current controversies and new insights. *Nat Rev Cancer* 5, 899-904.
- Bolontrade, M.F., Stern, M.C., Binder, R.L., Zenklusen, J.C., Gimenez-Conti, I.B. y Conti, C.J. (1998) Angiogenesis is an early event in the development of chemically induced skin tumors. *Carcinogenesis* 19, 2107-13.
- Bolos, V., Peinado, H., Perez-Moreno, M.A., Fraga, M.F., Esteller, M. y Cano, A. (2003) The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *J Cell Sci* 116, 499-511.
- Bolstad, B.M., Irizarry, R.A., Astrand, M. y Speed, T.P. (2003) A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* 19, 185-93.
- Bookstein, R., Rio, P., Madreperla, S.A., Hong, F., Allred, C., Grizzle, W.E. y Lee, W.H. (1990) Promoter deletion and loss of retinoblastoma gene expression in human prostate carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 7762-6.
- Botchkarev, V.A., Komarova, E.A., Siebenhaar, F., Botchkareva, N.V., Sharov, A.A., Komarov, P.G., Maurer, M., Gudkov, A.V. y Gilchrist, B.A. (2001) p53 Involvement in the control of murine hair follicle regression. *Am J Pathol* 158, 1913-9.
- Botchkarev, V.A. y Paus, R. (2003) Molecular biology of hair morphogenesis: development and cycling. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 298, 164-80.
- Boukamp, P. (2005) Non-melanoma skin cancer: what drives tumor development and progression? *Carcinogenesis* 26, 1657-67.
- Byrne, C., Tainsky, M. y Fuchs, E. (1994) Programming gene expression in developing epidermis. *Development* 120, 2369-83.
- Cano, A., Perez-Moreno, M.A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M.J., del Barrio, M.G., Portillo, F. y Nieto, M.A. (2000) The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2, 76-83.
- Carmeliet, P. y Jain, R.K. (2000) Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407, 249-57.

- Carnero, A., Blanco-Aparicio, C., Renner, O., Link, W. y Leal, J.F. (2008) The PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications. *Curr Cancer Drug Targets* 8, 187-98.
- Carroll, P.E., Okuda, M., Horn, H.F., Biddinger, P., Stambrook, P.J., Gleich, L.L., Li, Y.Q., Tarapore, P. y Fukasawa, K. (1999) Centrosome hyperamplification in human cancer: chromosome instability induced by p53 mutation and/or Mdm2 overexpression. *Oncogene* 18, 1935-44.
- Casanova, M.L., Larcher, F., Casanova, B., Murillas, R., Fernandez-Acenero, M.J., Villanueva, C., Martinez-Palacio, J., Ullrich, A., Conti, C.J. y Jorcano, J.L. (2002) A critical role for ras-mediated, epidermal growth factor receptor-dependent angiogenesis in mouse skin carcinogenesis. *Cancer Res* 62, 3402-7.
- Caulin, C., Nguyen, T., Lang, G.A., Goepfert, T.M., Brinkley, B.R., Cai, W.W., Lozano, G. y Roop, D.R. (2007) An inducible mouse model for skin cancer reveals distinct roles for gain- and loss-of-function p53 mutations. *J Clin Invest* 117, 1893-1901.
- Chan, J.A., Krichevsky, A.M. y Kosik, K.S. (2005) MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res* 65, 6029-33.
- Chang, D.L., Qiu, W., Ying, H., Zhang, Y., Chen, C.Y. y Xiao, Z.X. (2007) ARF promotes accumulation of retinoblastoma protein through inhibition of MDM2. *Oncogene*.
- Chen, R., Li, L. y Butte, A.J. (2007) AILUN: reannotating gene expression data automatically. *Nat Methods* 4, 879.
- Chipuk, J.E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N.M., Newmeyer, D.D., Schuler, M. y Green, D.R. (2004) Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* 303, 1010-4.
- Chumsri, S. y Burger, A.M. (2008) Cancer stem cell targeted agents: therapeutic approaches and consequences. *Curr Opin Mol Ther* 10, 323-33.
- Ciafre, S.A., Galardi, S., Mangiola, A., Ferracin, M., Liu, C.G., Sabatino, G., Negrini, M., Maira, G., Croce, C.M. y Farace, M.G. (2005) Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochem Biophys Res Commun* 334, 1351-8.
- Clarke, A.R., Maandag, E.R., van Roon, M., van der Lugt, N.M., van der Valk, M., Hooper, M.L., Berns, A. y te Riele, H. (1992) Requirement for a functional Rb-1 gene in murine development. *Nature* 359, 328-30.
- Classon, M. y Dyson, N. (2001) p107 and p130: versatile proteins with interesting pockets. *Exp Cell Res* 264, 135-47.

- Cotsarelis, G. (2006) Epithelial stem cells: a folliculocentric view. *J Invest Dermatol* 126, 1459-68.
- Crichton, D., Wilkinson, S., O'Prey, J., Syed, N., Smith, P., Harrison, P.R., Gasco, M., Garrone, O., Crook, T. y Ryan, K.M. (2006) DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell* 126, 121-34.
- D'Assoro, A.B., Busby, R., Acu, I.D., Quatraro, C., Reinholz, M.M., Farrugia, D.J., Schroeder, M.A., Allen, C., Stivala, F., Galanis, E. y Salisbury, J.L. (2008) Impaired p53 function leads to centrosome amplification, acquired ERalpha phenotypic heterogeneity and distant metastases in breast cancer MCF-7 xenografts. *Oncogene* 27, 3901-11.
- Dennis, G., Jr., Sherman, B.T., Hosack, D.A., Yang, J., Gao, W., Lane, H.C. y Lempicki, R.A. (2003) DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol* 4, P3.
- Derksen, P.W., Liu, X., Saridin, F., van der Gulden, H., Zevenhoven, J., Evers, B., van Beijnum, J.R., Griffioen, A.W., Vink, J., Krimpenfort, P., Peterse, J.L., Cardiff, R.D., Berns, A. y Jonkers, J. (2006) Somatic inactivation of E-cadherin and p53 in mice leads to metastatic lobular mammary carcinoma through induction of anoikis resistance and angiogenesis. *Cancer Cell* 10, 437-49.
- DiGiovanni, J. (1992) Multistage carcinogenesis in mouse skin. *Pharmacol Ther* 54, 63-128.
- Donehower, L.A., Harvey, M., Slagle, B.L., McArthur, M.J., Montgomery, C.A., Jr., Butel, J.S. y Bradley, A. (1992) Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 356, 215-21.
- Dyson, N. (1998) The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev* 12, 2245-62.
- Eberle, J., Fecker, L.F., Forscher, T., Ulrich, C., Rowert-Huber, J. y Stockfleth, E. (2007) Apoptosis pathways as promising targets for skin cancer therapy. *Br J Dermatol* 156 Suppl 3, 18-24.
- Ebert, M.S., Neilson, J.R. y Sharp, P.A. (2007) MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. *Nat Methods* 4, 721-6.
- Eckert, R.L. y Rorke, E.A. (1989) Molecular biology of keratinocyte differentiation. *Environ Health Perspect* 80, 109-16.
- Erb, P., Ji, J., Kump, E., Mielgo, A. y Wernli, M. (2008) Apoptosis and pathogenesis of melanoma and nonmelanoma skin cancer. *Adv Exp Med Biol* 624, 283-95.
- Esquela-Kerscher, A. y Slack, F.J. (2006) Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 6, 259-69.

- Esteller, M. y Herman, J.G. (2002) Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J Pathol* 196, 1-7.
- Eulalio, A., Huntzinger, E. y Izaurralde, E. (2008) Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell* 132, 9-14.
- Ewen, M.E., Xing, Y.G., Lawrence, J.B. y Livingston, D.M. (1991) Molecular cloning, chromosomal mapping, and expression of the cDNA for p107, a retinoblastoma gene product-related protein. *Cell* 66, 1155-64.
- Fleming, T.J., Fleming, M.L. y Malek, T.R. (1993) Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family. *J Immunol* 151, 2399-408.
- Friend, S.H., Bernards, R., Rogelj, S., Weinberg, R.A., Rapaport, J.M., Albert, D.M. y Dryja, T.P. (1986) A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 323, 643-6.
- Fuchs, E. (1990) Epidermal differentiation: the bare essentials. *J Cell Biol* 111, 2807-14.
- Fuchs, E. (2007) Scratching the surface of skin development. *Nature* 445, 834-42.
- Fuchs, E. y Nowak, J.A. (2008) Building Epithelial Tissues from Skin Stem Cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*.
- Fuchs, E. y Raghavan, S. (2002) Getting under the skin of epidermal morphogenesis. *Nat Rev Genet* 3, 199-209.
- Fukasawa, K. (2005) Centrosome amplification, chromosome instability and cancer development. *Cancer Lett* 230, 6-19.
- Fukasawa, K., Choi, T., Kuriyama, R., Rulong, S. y Vande Woude, G.F. (1996) Abnormal centrosome amplification in the absence of p53. *Science* 271, 1744-7.
- Gartel, A.L. y Kandel, E.S. (2008) miRNAs: Little known mediators of oncogenesis. *Semin Cancer Biol* 18, 103-10.
- Gerber, H.P., McMurtrey, A., Kowalski, J., Yan, M., Keyt, B.A., Dixit, V. y Ferrara, N. (1998) Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem* 273, 30336-43.
- Gregory, P.A., Bracken, C.P., Bert, A.G. y Goodall, G.J. (2008) MicroRNAs as regulators of epithelial-mesenchymal transition. *Cell Cycle* 7, 3112-8.
- Grubauer, G., Feingold, K.R., Harris, R.M. y Elias, P.M. (1989) Lipid content and lipid type as determinants of the epidermal permeability barrier. *J Lipid Res* 30, 89-96.

- Gupta, R., Singh, S., Hedau, S., Nigam, S., Das, B.C., Singh, I. y Mandal, A.K. (2007) Spindle cell carcinoma of head and neck: an immunohistochemical and molecular approach to its pathogenesis. *J Clin Pathol* 60, 472-5.
- Hanahan, D. y Folkman, J. (1996) Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86, 353-64.
- Hanahan, D. y Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Hannon, G.J., Demetrick, D. y Beach, D. (1993) Isolation of the Rb-related p130 through its interaction with CDK2 and cyclins. *Genes Dev* 7, 2378-91.
- Harbour, J.W., Lai, S.L., Whang-Peng, J., Gazdar, A.F., Minna, J.D. y Kaye, F.J. (1988) Abnormalities in structure and expression of the human retinoblastoma gene in SCLC. *Science* 241, 353-7.
- Harmey, J.H., Bucana, C.D., Lu, W., Byrne, A.M., McDonnell, S., Lynch, C., Bouchier-Hayes, D. y Dong, Z. (2002) Lipopolysaccharide-induced metastatic growth is associated with increased angiogenesis, vascular permeability and tumor cell invasion. *Int J Cancer* 101, 415-22.
- Harris, S.L. y Levine, A.J. (2005) The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene* 24, 2899-908.
- Harvey, M., Vogel, H., Lee, E.Y., Bradley, A. y Donehower, L.A. (1995) Mice deficient in both p53 and Rb develop tumors primarily of endocrine origin. *Cancer Res* 55, 1146-51.
- Hay, E.D. (1982) Interaction of embryonic surface and cytoskeleton with extracellular matrix. *Am J Anat* 165, 1-12.
- He, L., He, X., Lim, L.P., de Stanchina, E., Xuan, Z., Liang, Y., Xue, W., Zender, L., Magnus, J., Ridzon, D., Jackson, A.L., Linsley, P.S., Chen, C., Lowe, S.W., Cleary, M.A. y Hannon, G.J. (2007a) A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature* 447, 1130-4.
- He, X., He, L. y Hannon, G.J. (2007b) The guardian's little helper: microRNAs in the p53 tumor suppressor network. *Cancer Res* 67, 11099-101.
- Hermeking, H. (2007) p53 enters the microRNA world. *Cancer Cell* 12, 414-8.
- Hibberts, N.A., Messenger, A.G. y Randall, V.A. (1996) Dermal papilla cells derived from beard hair follicles secrete more stem cell factor (SCF) in culture than scalp cells or dermal fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 222, 401-5.
- Hicklin, D.J. y Ellis, L.M. (2005) Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol* 23, 1011-27.

- Hodgson, G., Hager, J.H., Volik, S., Hariono, S., Wernick, M., Moore, D., Nowak, N., Albertson, D.G., Pinkel, D., Collins, C., Hanahan, D. y Gray, J.W. (2001) Genome scanning with array CGH delineates regional alterations in mouse islet carcinomas. *Nat Genet* 29, 459-64.
- Holstege, H., Joosse, S.A., van Oostrom, C.T., Nederlof, P.M., de Vries, A. y Jonkers, J. (2009) High incidence of protein-truncating TP53 mutations in BRCA1-related breast cancer. *Cancer Res* 69, 3625-33.
- Huntly, B.J. y Gilliland, D.G. (2005) Cancer biology: summing up cancer stem cells. *Nature* 435, 1169-70.
- Hvid, H., Teige, I., Kvist, P.H., Svensson, L. y Kemp, K. (2008) TPA induction leads to a Th17-like response in transgenic K14/VEGF mice: a novel in vivo screening model of psoriasis. *Int Immunol* 20, 1097-106.
- Iorio, M.V., Ferracin, M., Liu, C.G., Veronese, A., Spizzo, R., Sabbioni, S., Magri, E., Pedriali, M., Fabbri, M., Campiglio, M., Menard, S., Palazzo, J.P., Rosenberg, A., Musiani, P., Volinia, S., Nenci, I., Calin, G.A., Querzoli, P., Negrini, M. y Croce, C.M. (2005) MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 65, 7065-70.
- Irizarry, R.A., Bolstad, B.M., Collin, F., Cope, L.M., Hobbs, B. y Speed, T.P. (2003) Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res* 31, e15.
- Jacks, T., Fazeli, A., Schmitt, E.M., Bronson, R.T., Goodell, M.A. y Weinberg, R.A. (1992) Effects of an Rb mutation in the mouse. *Nature* 359, 295-300.
- Jackson, M.W. y Berberich, S.J. (2000) MdmX protects p53 from Mdm2-mediated degradation. *Mol Cell Biol* 20, 1001-7.
- Jiang, B.H., Zheng, J.Z., Aoki, M. y Vogt, P.K. (2000) Phosphatidylinositol 3-kinase signaling mediates angiogenesis and expression of vascular endothelial growth factor in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 1749-53.
- Jones, R.J. (2006) Strategies to eliminate cancer stem cells. *Ernst Schering Found Symp Proc*, 219-30.
- Jonkers, J., Meuwissen, R., van der Gulden, H., Peterse, H., van der Valk, M. y Berns, A. (2001) Synergistic tumor suppressor activity of BRCA2 and p53 in a conditional mouse model for breast cancer. *Nat Genet* 29, 418-25.
- Juven-Gershon, T. y Oren, M. (1999) Mdm2: the ups and downs. *Mol Med* 5, 71-83.

- Kamijo, T., Weber, J.D., Zambetti, G., Zindy, F., Roussel, M.F. y Sherr, C.J. (1998) Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8292-7.
- Kamstrup, M., Faurschou, A., Gniadecki, R. y Wulf, H.C. (2008) Epidermal stem cells - role in normal, wounded and pathological psoriatic and cancer skin. *Curr Stem Cell Res Ther* 3, 146-50.
- Kang, Y. y Massague, J. (2004) Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell* 118, 277-9.
- Karin, M., Cao, Y., Greten, F.R. y Li, Z.W. (2002) NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer* 2, 301-10.
- Katoh, Y. y Katoh, M. (2008) Hedgehog signaling, epithelial-to-mesenchymal transition and miRNA (review). *Int J Mol Med* 22, 271-5.
- Kaur, P. (2006) Interfollicular epidermal stem cells: identification, challenges, potential. *J Invest Dermatol* 126, 1450-8.
- Kemp, C.J., Donehower, L.A., Bradley, A. y Balmain, A. (1993) Reduction of p53 gene dosage does not increase initiation or promotion but enhances malignant progression of chemically induced skin tumors. *Cell* 74, 813-22.
- Kobiela, K., Stokes, N., de la Cruz, J., Polak, L. y Fuchs, E. (2007) Loss of a quiescent niche but not follicle stem cells in the absence of bone morphogenetic protein signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 10063-8.
- Komarova, E.A., Krivokrysenko, V., Wang, K., Neznanov, N., Chernov, M.V., Komarov, P.G., Brennan, M.L., Golovkina, T.V., Rokhlin, O.W., Kuprash, D.V., Nedospasov, S.A., Hazen, S.L., Feinstein, E. y Gudkov, A.V. (2005) p53 is a suppressor of inflammatory response in mice. *Faseb J* 19, 1030-2.
- Korpal, M., Lee, E.S., Hu, G. y Kang, Y. (2008) The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2. *J Biol Chem* 283, 14910-4.
- Kundu, J.K. y Surh, Y.J. (2008) Inflammation: gearing the journey to cancer. *Mutat Res* 659, 15-30.
- Kuperwasser, C., Dessain, S., Bierbaum, B.E., Garnet, D., Sperandio, K., Gauvin, G.P., Naber, S.P., Weinberg, R.A. y Rosenblatt, M. (2005) A mouse model of human breast cancer metastasis to human bone. *Cancer Res* 65, 6130-8.

- Laird, P.W., Zijderveld, A., Linders, K., Rudnicki, M.A., Jaenisch, R. y Berns, A. (1991) Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Res* 19, 4293.
- Lara, M.F., Garcia-Escudero, R., Ruiz, S., Santos, M., Moral, M., Martinez-Cruz, A.B., Segrelles, C., Lorz, C. y Paramio, J.M. (2008a) Gene profiling approaches help to define the specific functions of retinoblastoma family in epidermis. *Mol Carcinog* 47, 209-21.
- Lara, M.F., Santos, M., Ruiz, S., Segrelles, C., Moral, M., Martinez-Cruz, A.B., Hernandez, P., Martinez-Palacio, J., Lorz, C., Garcia-Escudero, R. y Paramio, J.M. (2008b) p107 acts as a tumor suppressor in pRb-deficient epidermis. *Mol Carcinog* 47, 105-13.
- Larcher, F., Murillas, R., Bolontrade, M., Conti, C.J. y Jorcano, J.L. (1998) VEGF/VPF overexpression in skin of transgenic mice induces angiogenesis, vascular hyperpermeability and accelerated tumor development. *Oncogene* 17, 303-11.
- Larcher, F., Robles, A.I., Duran, H., Murillas, R., Quintanilla, M., Cano, A., Conti, C.J. y Jorcano, J.L. (1996) Up-regulation of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in mouse skin carcinogenesis correlates with malignant progression state and activated H-ras expression levels. *Cancer Res* 56, 5391-6.
- Laurie, N.A., Donovan, S.L., Shih, C.S., Zhang, J., Mills, N., Fuller, C., Teunisse, A., Lam, S., Ramos, Y., Mohan, A., Johnson, D., Wilson, M., Rodriguez-Galindo, C., Quarto, M., Francoz, S., Mendrysa, S.M., Guy, R.K., Marine, J.C., Jochemsen, A.G. y Dyer, M.A. (2006) Inactivation of the p53 pathway in retinoblastoma. *Nature* 444, 61-6.
- Lavker, R.M. y Sun, T.T. (1983) Epidermal stem cells. *J Invest Dermatol* 81, 121s-7s.
- Lee, E.Y., Chang, C.Y., Hu, N., Wang, Y.C., Lai, C.C., Herrup, K., Lee, W.H. y Bradley, A. (1992) Mice deficient for Rb are nonviable and show defects in neurogenesis and haematopoiesis. *Nature* 359, 288-94.
- Lee, E.Y., To, H., Shew, J.Y., Bookstein, R., Scully, P. y Lee, W.H. (1988) Inactivation of the retinoblastoma susceptibility gene in human breast cancers. *Science* 241, 218-21.
- Lee, J.T., Lehmann, B.D., Terrian, D.M., Chappell, W.H., Stivala, F., Libra, M., Martelli, A.M., Steelman, L.S. y McCubrey, J.A. (2008) Targeting prostate cancer based on signal transduction and cell cycle pathways. *Cell Cycle* 7, 1745-62.
- Lena, A.M., Shalom-Feuerstein, R., Rivetti di Val Cervo, P., Aberdam, D., Knight, R.A., Melino, G. y Candi, E. (2008) miR-203 represses 'stemness' by repressing DeltaNp63. *Cell Death Differ* 15, 1187-95.
- Li, A.G., Lu, S.L., Han, G., Hoot, K.E. y Wang, X.J. (2006) Role of TGFbeta in skin inflammation and carcinogenesis. *Mol Carcinog* 45, 389-96.

- Li, Q. y Verma, I.M. (2002) NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2, 725-34.
- Li, Y. y Prives, C. (2007) Are interactions with p63 and p73 involved in mutant p53 gain of oncogenic function? *Oncogene* 26, 2220-5.
- Lindner, G., Botchkarev, V.A., Botchkareva, N.V., Ling, G., van der Veen, C. y Paus, R. (1997) Analysis of apoptosis during hair follicle regression (catagen). *Am J Pathol* 151, 1601-17.
- Liu, X., Holstege, H., van der Gulden, H., Treur-Mulder, M., Zevenhoven, J., Velds, A., Kerkhoven, R.M., van Vliet, M.H., Wessels, L.F., Peterse, J.L., Berns, A. y Jonkers, J. (2007) Somatic loss of BRCA1 and p53 in mice induces mammary tumors with features of human BRCA1-mutated basal-like breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Lobo, N.A., Shimono, Y., Qian, D. y Clarke, M.F. (2007) The biology of cancer stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23, 675-99.
- Loffler, D., Brocke-Heidrich, K., Pfeifer, G., Stocsits, C., Hackermuller, J., Kretzschmar, A.K., Burger, R., Gramatzki, M., Blumert, C., Bauer, K., Cvijic, H., Ullmann, A.K., Stadler, P.F. y Horn, F. (2007) Interleukin-6 dependent survival of multiple myeloma cells involves the Stat3-mediated induction of microRNA-21 through a highly conserved enhancer. *Blood* 110, 1330-3.
- Lorz, C., Segrelles, C. y Paramio, J.M. (2009) On the origin of epidermal cancers. *Curr Mol Med* 9, 353-64.
- Ma, D.R., Yang, E.N. y Lee, S.T. (2004) A review: the location, molecular characterisation and multipotency of hair follicle epidermal stem cells. *Ann Acad Med Singapore* 33, 784-8.
- Ma, L. y Weinberg, R.A. (2008) Micromanagers of malignancy: role of microRNAs in regulating metastasis. *Trends Genet* 24, 448-56.
- Macleod, K.F., Hu, Y. y Jacks, T. (1996) Loss of Rb activates both p53-dependent and independent cell death pathways in the developing mouse nervous system. *Embo J* 15, 6178-88.
- Macpherson, D. (2008) Insights from mouse models into human retinoblastoma. *Cell Div* 3, 9.
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A. y Balkwill, F. (2008) Cancer-related inflammation. *Nature* 454, 436-44.
- Marchenko, N.D., Zaika, A. y Moll, U.M. (2000) Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *J Biol Chem* 275, 16202-12.
- Marine, J.C. y Jochemsen, A.G. (2005) Mdmx as an essential regulator of p53 activity. *Biochem Biophys Res Commun* 331, 750-60.

- Marino, S., Vooijs, M., van Der Gulden, H., Jonkers, J. y Berns, A. (2000) Induction of medulloblastomas in p53-null mutant mice by somatic inactivation of Rb in the external granular layer cells of the cerebellum. *Genes Dev* 14, 994-1004.
- Maser, R.S., Choudhury, B., Campbell, P.J., Feng, B., Wong, K.K., Protopopov, A., O'Neil, J., Gutierrez, A., Ivanova, E., Perna, I., Lin, E., Mani, V., Jiang, S., McNamara, K., Zaghlul, S., Edkins, S., Stevens, C., Brennan, C., Martin, E.S., Wiedemeyer, R., Kabbarah, O., Nogueira, C., Histen, G., Aster, J., Mansour, M., Duke, V., Foroni, L., Fielding, A.K., Goldstone, A.H., Rowe, J.M., Wang, Y.A., Look, A.T., Stratton, M.R., Chin, L., Futreal, P.A. y DePinho, R.A. (2007) Chromosomally unstable mouse tumours have genomic alterations similar to diverse human cancers. *Nature* 447, 966-71.
- Massague, J. (2008) TGFbeta in Cancer. *Cell* 134, 215-30.
- Massaous, J. y Hata, A. (1997) TGF-beta signalling through the Smad pathway. *Trends Cell Biol* 7, 187-92.
- Mattes, J., Yang, M. y Foster, P.S. (2007) Regulation of microRNA by antagomirs: a new class of pharmacological antagonists for the specific regulation of gene function? *Am J Respir Cell Mol Biol* 36, 8-12.
- Meek, D.W. (2000) The role of p53 in the response to mitotic spindle damage. *Pathol Biol (Paris)* 48, 246-54.
- Mihara, M., Erster, S., Zaika, A., Petrenko, O., Chittenden, T., Pancoska, P. y Moll, U.M. (2003) p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell* 11, 577-90.
- Mirones, I., Conti, C.J., Martinez, J., Garcia, M. y Larcher, F. (2009) Complexity of VEGF responses in skin carcinogenesis revealed through ex vivo assays based on a VEGF-A null mouse keratinocyte cell line. *J Invest Dermatol* 129, 730-41.
- Montaner, D., Tarraga, J., Huerta-Cepas, J., Burguet, J., Vaquerizas, J.M., Conde, L., Minguéz, P., Vera, J., Mukherjee, S., Valls, J., Pujana, M.A., Alloza, E., Herrero, J., Al-Shahrour, F. y Dopazo, J. (2006) Next station in microarray data analysis: GEPAS. *Nucleic Acids Res* 34, W486-91.
- Morgenbesser, S.D., Williams, B.O., Jacks, T. y DePinho, R.A. (1994) p53-dependent apoptosis produced by Rb-deficiency in the developing mouse lens. *Nature* 371, 72-4.
- Moustakas, A. y Heldin, C.H. (2007) Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression. *Cancer Sci* 98, 1512-20.
- Nevins, J.R. (1998) Toward an understanding of the functional complexity of the E2F and retinoblastoma families. *Cell Growth Differ* 9, 585-93.

- O'Donnell, K.A., Wentzel, E.A., Zeller, K.I., Dang, C.V. y Mendell, J.T. (2005) c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* 435, 839-43.
- Oikawa, T., Okuda, M., Ma, Z., Goorha, R., Tsujimoto, H., Inokuma, H. y Fukasawa, K. (2005) Transcriptional control of BubR1 by p53 and suppression of centrosome amplification by BubR1. *Mol Cell Biol* 25, 4046-61.
- Oren, M. (2003) Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ* 10, 431-42.
- Padua, D. y Massague, J. (2009) Roles of TGFbeta in metastasis. *Cell Res* 19, 89-102.
- Padua, D., Zhang, X.H., Wang, Q., Nadal, C., Gerald, W.L., Gomis, R.R. y Massague, J. (2008) TGFbeta primes breast tumors for lung metastasis seeding through angiopoietin-like 4. *Cell* 133, 66-77.
- Papagiannakopoulos, T., Shapiro, A. y Kosik, K.S. (2008) MicroRNA-21 targets a network of key tumor-suppressive pathways in glioblastoma cells. *Cancer Res* 68, 8164-72.
- Peinado, H., Olmeda, D. y Cano, A. (2007) Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer* 7, 415-28.
- Plewig, G., Jansen, T. y Schurer, N.Y. (1997) [Stratum corneum]. *Hautarzt* 48, 510-21; quiz 520.
- Pomerantz, J., Schreiber-Agus, N., Liegeois, N.J., Silverman, A., Alland, L., Chin, L., Potes, J., Chen, K., Orlow, I., Lee, H.W., Cordon-Cardo, C. y DePinho, R.A. (1998) The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* 92, 713-23.
- Potten, C.S. y Morris, R.J. (1988) Epithelial stem cells in vivo. *J Cell Sci Suppl* 10, 45-62.
- Potts, R.O. y Francoeur, M.L. (1991) The influence of stratum corneum morphology on water permeability. *J Invest Dermatol* 96, 495-9.
- Qian, B., Katsaros, D., Lu, L., Preti, M., Durando, A., Arisio, R., Mu, L. y Yu, H. (2008) High miR-21 expression in breast cancer associated with poor disease-free survival in early stage disease and high TGF-beta1. *Breast Cancer Res Treat.*
- Quintana, E., Shackleton, M., Sabel, M.S., Fullen, D.R., Johnson, T.M. y Morrison, S.J. (2008) Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature* 456, 593-8.
- Raj, D., Brash, D.E. y Grossman, D. (2006) Keratinocyte apoptosis in epidermal development and disease. *J Invest Dermatol* 126, 243-57.
- Ramirez, A., Bravo, A., Jorcano, J.L. y Vidal, M. (1994) Sequences 5' of the bovine keratin 5 gene direct tissue- and cell-type-specific expression of a lacZ gene in the adult and during development. *Differentiation* 58, 53-64.

- Ramirez, A., Vidal, M., Bravo, A., Larcher, F. y Jorcano, J.L. (1995) A 5'-upstream region of a bovine keratin 6 gene confers tissue-specific expression and hyperproliferation-related induction in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 4783-7.
- Raver-Shapira, N. y Oren, M. (2007) Tiny actors, great roles: microRNAs in p53's service. *Cell Cycle* 6, 2656-61.
- Rhodes, D.R., Kalyana-Sundaram, S., Tomlins, S.A., Mahavisno, V., Kasper, N., Varambally, R., Barrette, T.R., Ghosh, D., Varambally, S. y Chinnaiyan, A.M. (2007) Molecular concepts analysis links tumors, pathways, mechanisms, and drugs. *Neoplasia* 9, 443-54.
- Ruiz, S., Santos, M., Lara, M.F., Segrelles, C., Ballestin, C. y Paramio, J.M. (2005) Unexpected roles for pRb in mouse skin carcinogenesis. *Cancer Res* 65, 9678-86.
- Ruiz, S., Santos, M. y Paramio, J.M. (2006) Is the loss of pRb essential for the mouse skin carcinogenesis? *Cell Cycle* 5, 625-9.
- Ruiz, S., Santos, M., Segrelles, C., Leis, H., Jorcano, J.L., Berns, A., Paramio, J.M. y Vooijs, M. (2004) Unique and overlapping functions of pRb and p107 in the control of proliferation and differentiation in epidermis. *Development* 131, 2737-48.
- Ruiz, S., Segrelles, C., Bravo, A., Santos, M., Perez, P., Leis, H., Jorcano, J.L. y Paramio, J.M. (2003) Abnormal epidermal differentiation and impaired epithelial-mesenchymal tissue interactions in mice lacking the retinoblastoma relatives p107 and p130. *Development* 130, 2341-53.
- Russell, J.L., Powers, J.T., Rounbehler, R.J., Rogers, P.M., Conti, C.J. y Johnson, D.G. (2002) ARF differentially modulates apoptosis induced by E2F1 and Myc. *Mol Cell Biol* 22, 1360-8.
- Saeed, A.I., Sharov, V., White, J., Li, J., Liang, W., Bhagabati, N., Braisted, J., Klapa, M., Currier, T., Thiagarajan, M., Sturn, A., Snuffin, M., Rezantsev, A., Popov, D., Ryltsov, A., Kostukovich, E., Borisovsky, I., Liu, Z., Vinsavich, A., Trush, V. y Quackenbush, J. (2003) TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* 34, 374-8.
- Santarosa, M. y Ashworth, A. (2004) Haploinsufficiency for tumour suppressor genes: when you don't need to go all the way. *Biochim Biophys Acta* 1654, 105-22.
- Sauer, B. y Henderson, N. (1988) Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 5166-70.
- Sayed, D., Rane, S., Lypowy, J., He, M., Chen, I.Y., Vashistha, H., Yan, L., Malhotra, A., Vatner, D. y Abdellatif, M. (2008) MicroRNA-21 targets Sprouty2 and promotes cellular outgrowths. *Mol Biol Cell* 19, 3272-82.

- Schickel, R., Boyerinas, B., Park, S.M. y Peter, M.E. (2008) MicroRNAs: key players in the immune system, differentiation, tumorigenesis and cell death. *Oncogene* 27, 5959-74.
- Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., Lightfoot, S., Menzel, W., Granzow, M. y Ragg, T. (2006) The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol* 7, 3.
- Segrelles, C., Lu, J., Hammann, B., Santos, M., Moral, M., Cascallana, J.L., Lara, M.F., Rho, O., Carbajal, S., Traag, J., Beltran, L., Martinez-Cruz, A.B., Garcia-Escudero, R., Lorz, C., Ruiz, S., Bravo, A., Paramio, J.M. y DiGiovanni, J. (2007) Deregulated activity of Akt in epithelial basal cells induces spontaneous tumors and heightened sensitivity to skin carcinogenesis. *Cancer Res* 67, 10879-88.
- Segrelles, C., Moral, M., Lara, M.F., Ruiz, S., Santos, M., Leis, H., Garcia-Escudero, R., Martinez-Cruz, A.B., Martinez-Palacio, J., Hernandez, P., Ballestin, C. y Paramio, J.M. (2006) Molecular determinants of Akt-induced keratinocyte transformation. *Oncogene* 25, 1174-85.
- Segrelles, C., Moral, M., Lorz, C., Santos, M., Lu, J., Cascallana, J.L., Lara, M.F., Carbajal, S., Martinez-Cruz, A.B., Garcia-Escudero, R., Beltran, L., Segovia, J.C., Bravo, A., DiGiovanni, J. y Paramio, J.M. (2008) Constitutively active Akt induces ectodermal defects and impaired bone morphogenetic protein signaling. *Mol Biol Cell* 19, 137-49.
- Segrelles, C., Ruiz, S., Perez, P., Murga, C., Santos, M., Budunova, I.V., Martinez, J., Larcher, F., Slaga, T.J., Gutkind, J.S., Jorcano, J.L. y Paramio, J.M. (2002) Functional roles of Akt signaling in mouse skin tumorigenesis. *Oncogene* 21, 53-64.
- Segrelles, C., Ruiz, S., Santos, M., Martinez-Palacio, J., Lara, M.F. y Paramio, J.M. (2004) Akt mediates an angiogenic switch in transformed keratinocytes. *Carcinogenesis* 25, 1137-47.
- Seoane, J. (2008) The TGFβ pathway as a therapeutic target in cancer. *Clin Transl Oncol* 10, 14-9.
- Setoguchi, A., Okuda, M., Nishida, E., Yazawa, M., Ishizaka, T., Hong, S.H., Hisasue, M., Nishimura, R., Sasaki, N., Yoshikawa, Y., Masuda, K., Ohno, K. y Tsujimoto, H. (2001) Results of hyperamplification of centrosomes in naturally developing tumors of dogs. *Am J Vet Res* 62, 1134-41.
- Shaw, A.T., Meissner, A., Dowdle, J.A., Crowley, D., Magendantz, M., Ouyang, C., Parisi, T., Rajagopal, J., Blank, L.J., Bronson, R.T., Stone, J.R., Tuveson, D.A., Jaenisch, R. y Jacks, T. (2007) Sprouty-2 regulates oncogenic K-ras in lung development and tumorigenesis. *Genes Dev* 21, 694-707.

- Sherr, C.J. y McCormick, F. (2002) The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* 2, 103-12.
- Shimaoka, S., Imai, R. y Ogawa, H. (1994) Dermal papilla cells express hepatocyte growth factor. *J Dermatol Sci* 7 Suppl, S79-83.
- Si, M.L., Zhu, S., Wu, H., Lu, Z., Wu, F. y Mo, Y.Y. (2007) miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene* 26, 2799-803.
- Sinha, S. y Fuchs, E. (2001) Identification and dissection of an enhancer controlling epithelial gene expression in skin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 2455-60.
- Slaga, T.J., Budunova, I.V., Gimenez-Conti, I.B. y Aldaz, C.M. (1996) The mouse skin carcinogenesis model. *J Invest Dermatol Symp Proc* 1, 151-6.
- Slaga, T.J., O'Connell, J., Rotstein, J., Patskan, G., Morris, R., Aldaz, C.M. y Conti, C.J. (1986) Critical genetic determinants and molecular events in multistage skin carcinogenesis. *Symp Fundam Cancer Res* 39, 31-44.
- Smit, M.A. y Peeper, D.S. (2008) Deregulating EMT and senescence: double impact by a single twist. *Cancer Cell* 14, 5-7.
- Springer, T., Galfre, G., Secher, D.S. y Milstein, C. (1979) Mac-1: a macrophage differentiation antigen identified by monoclonal antibody. *Eur J Immunol* 9, 301-6.
- Stenn, K.S. y Paus, R. (2001) Controls of hair follicle cycling. *Physiol Rev* 81, 449-494.
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V.K., Mukherjee, S., Ebert, B.L., Gillette, M.A., Paulovich, A., Pomeroy, S.L., Golub, T.R., Lander, E.S. y Mesirov, J.P. (2005) Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 15545-50.
- Talotta, F., Cimmino, A., Matarazzo, M.R., Casalino, L., De Vita, G., D'Esposito, M., Di Lauro, R. y Verde, P. (2009) An autoregulatory loop mediated by miR-21 and PDCD4 controls the AP-1 activity in RAS transformation. *Oncogene* 28, 73-84.
- Tarapore, P. y Fukasawa, K. (2000) p53 mutation and mitotic infidelity. *Cancer Invest* 18, 148-55.
- Tavazoie, S.F., Alarcon, C., Oskarsson, T., Padua, D., Wang, Q., Bos, P.D., Gerald, W.L. y Massague, J. (2008) Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature* 451, 147-52.
- Tergaonkar, V. y Perkins, N.D. (2007) p53 and NF-kappaB crosstalk: IKKalpha tips the balance. *Mol Cell* 26, 158-9.
- Thiery, J.P. (2002) Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2, 442-54.

- Thum, T., Gross, C., Fiedler, J., Fischer, T., Kissler, S., Bussen, M., Galuppo, P., Just, S., Rottbauer, W., Frantz, S., Castoldi, M., Soutschek, J., Koteliansky, V., Rosenwald, A., Basson, M.A., Licht, J.D., Pena, J.T., Rouhanifard, S.H., Muckenthaler, M.U., Tuschl, T., Martin, G.R., Bauersachs, J. y Engelhardt, S. (2008) MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature* 456, 980-4.
- Tokura, Y., Kobayashi, M. y Kabashima, K. (2008) Epidermal chemokines and modulation by antihistamines, antibiotics and antifungals. *Exp Dermatol* 17, 81-90.
- Tomasini, R., Mak, T.W. y Melino, G. (2008) The impact of p53 and p73 on aneuploidy and cancer. *Trends Cell Biol* 18, 244-52.
- Uchi, H., Terao, H., Koga, T. y Furue, M. (2000) Cytokines and chemokines in the epidermis. *J Dermatol Sci* 24 Suppl 1, S29-38.
- Valencia-Sanchez, M.A., Liu, J., Hannon, G.J. y Parker, R. (2006) Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev* 20, 515-24.
- Visvader, J.E. y Lindeman, G.J. (2008) Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer* 8, 755-68.
- Vivanco, I. y Sawyers, C.L. (2002) The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2, 489-501.
- Vogelstein, B. y Kinzler, K.W. (2004) Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 10, 789-99.
- Vogelstein, B., Lane, D. y Levine, A.J. (2000) Surfing the p53 network. *Nature* 408, 307-10.
- Vooijs, M., te Riele, H., van der Valk, M. y Berns, A. (2002) Tumor formation in mice with somatic inactivation of the retinoblastoma gene in interphotoreceptor retinol binding protein-expressing cells. *Oncogene* 21, 4635-45.
- Vousden, K.H. y Lu, X. (2002) Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2, 594-604.
- Wahl, G.M. y Carr, A.M. (2001) The evolution of diverse biological responses to DNA damage: insights from yeast and p53. *Nat Cell Biol* 3, E277-86.
- Walkley, C.R., Qudsi, R., Sankaran, V.G., Perry, J.A., Gostissa, M., Roth, S.I., Rodda, S.J., Snay, E., Dunning, P., Fahey, F.H., Alt, F.W., McMahon, A.P. y Orkin, S.H. (2008) Conditional mouse osteosarcoma, dependent on p53 loss and potentiated by loss of Rb, mimics the human disease. *Genes Dev* 22, 1662-76.

- Wang, X.J., Greenhalgh, D.A., Jiang, A., He, D., Zhong, L., Medina, D., Brinkley, B.R. y Roop, D.R. (1998) Expression of a p53 mutant in the epidermis of transgenic mice accelerates chemical carcinogenesis. *Oncogene* 17, 35-45.
- Weaver, Z., Montagna, C., Xu, X., Howard, T., Gadina, M., Brodie, S.G., Deng, C.X. y Ried, T. (2002) Mammary tumors in mice conditionally mutant for Brca1 exhibit gross genomic instability and centrosome amplification yet display a recurring distribution of genomic imbalances that is similar to human breast cancer. *Oncogene* 21, 5097-107.
- Wells, A., Yates, C. y Shepard, C.R. (2008) E-cadherin as an indicator of mesenchymal to epithelial reverting transitions during the metastatic seeding of disseminated carcinomas. *Clin Exp Metastasis* 25, 621-8.
- Wen, S., Stolarov, J., Myers, M.P., Su, J.D., Wigler, M.H., Tonks, N.K. y Durden, D.L. (2001) PTEN controls tumor-induced angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4622-7.
- Wijnhoven, S.W., Speksnijder, E.N., Liu, X., Zwart, E., vanOostrom, C.T., Beems, R.B., Hoogervorst, E.M., Schaap, M.M., Attardi, L.D., Jacks, T., van Steeg, H., Jonkers, J. y de Vries, A. (2007) Dominant-negative but not gain-of-function effects of a p53.R270H mutation in mouse epithelium tissue after DNA damage. *Cancer Res* 67, 4648-56.
- Woodfin, A., Voisin, M.B. y Nourshargh, S. (2007) PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27, 2514-23.
- Xu, J., Lamouille, S. y Derynck, R. (2009) TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res* 19, 156-72.
- Xu, Y. (2008) Induction of genetic instability by gain-of-function p53 cancer mutants. *Oncogene* 27, 3501-7.
- Yakura, H., Ashida, T., Kawabata, I. y Katagiri, M. (1989) Alleviation of autoimmunity in BXSB mice by monoclonal alloantibody to Ly-5 (CD45). *Eur J Immunol* 19, 1505-8.
- Yang, H., He, L., Kruk, P., Nicosia, S.V. y Cheng, J.Q. (2006) Aurora-A induces cell survival and chemoresistance by activation of Akt through a p53-dependent manner in ovarian cancer cells. *Int J Cancer* 119, 2304-12.
- Yang, J. y Weinberg, R.A. (2008) Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell* 14, 818-29.
- Yi, R., O'Carroll, D., Pasolli, H.A., Zhang, Z., Dietrich, F.S., Tarakhovsky, A. y Fuchs, E. (2006) Morphogenesis in skin is governed by discrete sets of differentially expressed microRNAs. *Nat Genet* 38, 356-62.

- Yi, R., Poy, M.N., Stoffel, M. y Fuchs, E. (2008) A skin microRNA promotes differentiation by repressing 'stemness'. *Nature* 452, 225-9.
- Zavadil, J., Narasimhan, M., Blumenberg, M. y Schneider, R.J. (2007) Transforming growth factor-beta and microRNA:mRNA regulatory networks in epithelial plasticity. *Cells Tissues Organs* 185, 157-61.
- Zender, L., Spector, M.S., Xue, W., Flemming, P., Cordon-Cardo, C., Silke, J., Fan, S.T., Luk, J.M., Wigler, M., Hannon, G.J., Mu, D., Lucito, R., Powers, S. y Lowe, S.W. (2006) Identification and validation of oncogenes in liver cancer using an integrative oncogenomic approach. *Cell* 125, 1253-67.
- Zhang, B., Pan, X., Cobb, G.P. y Anderson, T.A. (2007) microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol* 302, 1-12.
- Zhang, J.Y., Green, C.L., Tao, S. y Khavari, P.A. (2004) NF-kappaB RelA opposes epidermal proliferation driven by TNFR1 and JNK. *Genes Dev* 18, 17-22.
- Zheng, S., El-Naggar, A.K., Kim, E.S., Kurie, J.M. y Lozano, G. (2007) A genetic mouse model for metastatic lung cancer with gender differences in survival. *Oncogene* 26, 6896-904.
- Zouboulis, C.C., Adjaye, J., Akamatsu, H., Moe-Behrens, G. y Niemann, C. (2008) Human skin stem cells and the ageing process. *Exp Gerontol*.

Anexo

Tabla A1
Genes implicados en procesos inflamatorios diferencialmente expresados en pieles de recién nacido murinas de los distintos genotipos

Probesets ID	Nombre del gen	Símbolo del gen	Variación en la expresión (log2)				p-val
			Control	Rb ^{ACE}	p53 ^{ACE}	Rb ^{ACE} ;p53 ^{ACE}	
1450019_at	chemokine (C-X3-C) receptor 1	Cx3cr1	0.33	1.20	-1.29	-0.23	0.00838
1417936_at	chemokine (C-C motif) ligand 9	Ccl9	-0.22	0.23	-1.29	1.28	0.00079
1418456_a_at	chemokine (C-X-C motif) ligand 14	Cxcl14	0.09	-1.33	1.28	-0.04	0.00095
1422029_at	chemokine (C-C motif) ligand 20	Ccl20	-0.82	0.19	-0.78	1.41	0.00607
1448823_at	chemokine (C-X-C motif) ligand 12	Cxcl12	-0.64	-1.14	0.57	1.20	0.00023
1448898_at	chemokine (C-C motif) ligand 9	Ccl9	-0.11	0.23	-1.34	1.23	0.00233
1460295_s_at	interleukin 6 signal transducer	Il6st	-1.60	0.52	0.70	0.38	0.00042
1416296_at	interleukin 2 receptor, gamma chain	Il2rg	-1.21	-0.20	0.07	1.34	0.00567
1418609_at	interleukin 1 family, member 6	Il1f6	-0.86	-0.53	-0.13	1.52	0.00295
1419532_at	interleukin 1 receptor, type II	Il1r2	-1.21	0.02	-0.18	1.36	0.00331
1421370_a_at	interleukin 1 family, member 5 (delta)	Il1f5	-0.97	-0.32	-0.20	1.50	0.00337
1422546_at	interleukin enhancer binding factor 3	Ilf3	-0.96	1.16	0.59	-0.79	0.00974
1425145_at	interleukin 1 receptor-like 1	Il1rl1	-0.29	-1.39	0.86	0.82	0.00068
1425958_at	interleukin 1 family, member 9	Il1f9	-1.12	0.02	-0.34	1.44	0.00042
1436802_at	interleukin enhancer binding factor 3	Ilf3	1.02	0.47	-0.06	-1.44	0.00391
1426278_at	interferon, alpha-inducible protein 27	Ifi27	-0.23	0.60	-1.40	1.04	0.00032
1448775_at	similar to interferon-inducible protein 203	LOC547362	-0.68	-0.64	-0.27	1.59	0.00007
1451567_a_at	interferon activated gene 203 /// similar to interferon-inducible protein 203	Ifi203 /// LOC547362	-0.27	-1.24	0.20	1.31	0.00227
1452231_x_at	similar to Interferon-activatable protein 205 (IFI-205) (D3 protein)	LOC545386	-0.54	-0.85	-0.12	1.51	0.00640
1452349_x_at	interferon activated gene 205 /// myeloid cell nuclear differentiation antigen	Ifi205 /// Mnda	0.50	-0.76	-0.98	1.24	0.00392
1419042_at	interferon inducible GTPase 1	Ilgp1	-0.42	-0.19	-0.93	1.54	0.00046
1419043_a_at	interferon inducible GTPase 1	Ilgp1	-0.54	-0.13	-0.86	1.53	0.00217
1421217_a_at	lectin, galactose binding, soluble 9	Lgals9	-1.43	0.64	-0.09	0.88	0.00951
1422308_a_at	lectin, galactose binding, soluble 7	Lgals7	0.51	1.25	-0.87	-0.89	0.00287
1448380_at	lectin, galactoside-binding, soluble, 3 binding protein	Lgals3bp	-0.21	0.53	-1.39	1.06	0.00241
1455439_a_at	lectin, galactose binding, soluble 1	Lgals1	-1.16	-0.46	0.35	1.27	0.00783
1450298_at	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 14	Tnfsf14	-1.08	-0.73	0.92	0.89	0.00370
1418424_at	tumor necrosis factor alpha induced protein 6	Tnfaip6	-0.23	-1.37	0.67	0.93	0.00864
1425212_a_at	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 19	Tnfrsf19	-0.89	0.65	1.15	-0.91	0.00262
1448147_at	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 19	Tnfrsf19	-0.03	-0.68	1.51	-0.79	0.00258
1419394_s_at	S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)	S100a8	-0.78	-0.86	0.20	1.45	0.00003
1450884_at	CD36 antigen	Cd36	-0.33	-0.57	-0.67	1.58	0.00261
1452483_a_at	CD44 antigen	Cd44	-1.55	0.84	0.23	0.48	0.00119
1417439_at	CD248 antigen, endosialin	Cd248	0.88	-1.54	0.43	0.23	0.00218
1419144_at	CD163 antigen	Cd163	-0.79	-1.03	1.07	0.76	0.00097
1423166_at	CD36 antigen	Cd36	-0.24	0.90	-1.39	0.73	0.00414
1429830_a_at	CD59a antigen	Cd59a	-0.28	0.04	-1.16	1.40	0.00218
1452878_at	protein kinase C, epsilon	Prkce	0.18	-1.43	0.16	1.09	0.00666
1421213_at	EDAR (ectodysplasin-A receptor)-associated death domain	Edaradd	0.92	-0.48	-1.29	0.85	0.00022

Tabla A2
Genes implicados en la vía Akt/ERK diferencialmente expresados en pieles de recién nacido murinas de los distintos genotipos

Probesets ID	Nombre del gen	Símbolo del gen	Variación en la expresión (log2)				p-val
			Control	RbΔCE	p53ΔCE	RbΔCE;p53ΔCE	
1438133_a_at	cysteine rich protein 61	Cyr61	-0.57	-0.58	-0.45	1.61	0.00032
1417262_at	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	Ptgs2	-0.64	-0.16	-0.75	1.55	0.00205
1419082_at	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 2	Serpib2	-0.73	-0.35	-0.48	1.57	0.00388
1419647_a_at	immediate early response 3	Ier3	-0.96	-0.48	-0.06	1.50	0.00139
1451530_at	epidermal growth factor receptor	Egfr	-0.48	1.59	-0.66	-0.45	0.00124
1426981_at	proprotein convertase subtilisin/kexin type 6	Pcsk6	-0.95	-0.63	0.12	1.45	0.00100
1435541_at	betacellulin, epidermal growth factor family member	Btc	-0.77	-0.32	-0.49	1.58	0.00086
1448830_at	dual specificity phosphatase 1	Dusp1	-0.85	-0.41	-0.30	1.56	0.00066
1448856_a_at	methionine sulfoxide reductase A	Msra	-1.13	0.35	-0.53	1.31	0.00212
1449888_at	endothelial PAS domain protein 1	Epas1	0.37	-0.85	-0.84	1.32	0.00478
1451871_a_at	growth hormone receptor	Ghr	-1.33	0.10	-0.03	1.26	0.00231
1416501_at	3-phosphoinositide dependent protein kinase-1	Pdk1	-0.90	-0.90	0.69	1.11	0.00452
1416985_at	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type substrate 1	Ptpns1	0.17	-1.38	0.01	1.21	0.00169
1418547_at	tissue factor pathway inhibitor 2	Tfpi2	-0.37	-1.05	-0.05	1.47	0.00156
1419394_s_at	S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)	S100a8	-0.78	-0.86	0.20	1.45	0.00003
1433899_x_at	TSC22 domain family, member 1	Tsc22d1	-0.47	-1.25	0.69	1.04	0.00348
1437301_a_at	dishevelled, dsh homolog 1 (Drosophila)	Dvl1	-0.73	-1.01	0.44	1.30	0.00108
1438390_s_at	pituitary tumor-transforming 1	Pttg1	-0.25	-1.39	0.78	0.86	0.00313
1448823_at	chemokine (C-X-C motif) ligand 12	Cxcl12	-0.64	-1.14	0.57	1.20	0.00023
1448985_at	dual specificity phosphatase 22	Dusp22	-0.55	-1.09	0.26	1.38	0.00019
1449187_at	platelet derived growth factor, alpha	Pdgfa	-0.39	-1.28	0.64	1.03	0.00815
1450976_at	N-myc downstream regulated gene 1	Ndr1	0.06	-1.50	0.44	1.00	0.00025
1421213_at	EDAR (ectodysplasin-A receptor)-associated death domain	Edaradd	0.92	-0.48	-1.29	0.85	0.00022
1451753_at	plexin A2	Plxna2	1.00	0.81	-0.75	-1.07	0.00268
1416129_at	ERBB receptor feedback inhibitor 1	Erff1	0.54	1.21	-0.62	-1.13	0.00084
1427037_at	eukaryotic translation initiation factor 4, gamma 1	Eif4g1	-1.49	0.81	0.70	-0.03	0.00264
1438686_at	eukaryotic translation initiation factor 4, gamma 1 /// similar to Eif4g1 protein	Eif4g1 /// LOC547244	-1.23	1.20	0.45	-0.42	0.00464
1419485_at	forkhead box C1	Foxc1	0.76	0.99	-0.53	-1.23	0.00395
1416983_s_at	forkhead box O1	Foxo1	1.44	0.12	-0.66	-0.90	0.00376
1421140_a_at	forkhead box P1	Foxp1	0.72	1.07	-0.71	-1.08	0.00416
1426673_at	cadherin 3	Cdh3	0.10	1.46	-0.67	-0.90	0.00119
1416081_at	MAD homolog 1 (Drosophila)	Smad1	0.61	0.98	-0.18	-1.41	0.00362
1415899_at	Jun-B oncogene	Junb	0.57	1.17	-1.20	-0.55	0.00038
1421340_at	mitogen activated protein kinase kinase 5	Map3k5	0.82	1.00	-1.09	-0.73	0.00184
1448152_at	insulin-like growth factor 2	Igf2	-1.37	-0.06	0.23	1.20	0.00236
1439016_x_at	small proline-rich protein 2A	Spr2a (Spry2)	-0.30	-0.81	-0.47	1.58	0.00048
1416009_at	tetraspanin 3	Tspan3	-0.52	-1.25	1.00	0.77	0.00100

Tabla A3
Genes implicados en angiogénesis diferencialmente expresados en pieles de recién nacido murinas de los distintos genotipos

Probesets ID	Nombre del gen	Símbolo del gen	Variación en la expresión (log2)				p-val
			Control	<i>Rb</i> ^{ACE}	<i>p53</i> ^{ACE}	<i>Rb</i> ^{ACE} ; <i>p53</i> ^{ACE}	
1453470_a_at	guanine nucleotide binding protein, alpha 13	Gna13	-1.58	0.45	0.54	0.59	0.00309
1430295_at	guanine nucleotide binding protein, alpha 13	Gna13	-0.82	-0.82	1.41	0.23	0.00231
1418237_s_at	procollagen, type XVIII, alpha 1	Col18a1	1.19	0.55	-0.59	-1.15	0.00179
1427049_s_at	smoothened homolog (Drosophila)	Smo	1.12	-0.23	0.46	-1.34	0.00446
1424797_a_at	paired-like homeodomain transcription factor 2	Pitx2	-0.67	-1.12	1.17	0.61	0.00047
1448823_at	chemokine (C-X-C motif) ligand 12	Cxcl12	-0.64	-1.14	0.57	1.20	0.00023
1450377_at	thrombospondin 1	Thbs1	-0.94	0.60	-0.81	1.16	0.00878
1419431_at	epiregulin	Ereg	-0.61	0.29	-1.03	1.36	0.00283
1433956_at	cadherin 5	Cdh5	0.65	-0.46	-1.23	1.05	0.00952
1449187_at	platelet derived growth factor, alpha	Pdgfa	-0.39	-1.28	0.64	1.03	0.00815
1421198_at	integrin alpha V	Itgav	-1.58	0.35	0.60	0.62	0.00279
1452784_at	integrin alpha V	Itgav	0.38	-1.55	0.71	0.46	0.00911
1451873_a_at	MAD homolog 5 (Drosophila)	Smad5	-1.22	-0.49	0.63	1.08	0.00555
1449888_at	endothelial PAS domain protein 1	Epas1	0.37	-0.85	-0.84	1.32	0.00478
1425597_a_at	quaking	Qk	-0.52	1.51	-0.86	-0.13	0.00473
1450922_a_at	transforming growth factor, beta 2	Tgfb2	0.23	-1.52	0.90	0.39	0.00453
1421116_a_at	reticulin 4	Rtn4	-1.26	-0.46	1.03	0.69	0.00436
1453724_a_at	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade F, member 1	Serpinf1	-1.52	0.28	0.29	0.95	0.00315
1438133_a_at	cysteine rich protein 61	Cyr61	-0.57	-0.58	-0.45	1.61	0.00032
1416039_x_at	cysteine rich protein 61	Cyr61	-0.49	-0.36	-0.73	1.58	0.00163
1416983_s_at	forkhead box O1	Foxo1	1.44	0.12	-0.66	-0.90	0.00376
1460227_at	tissue inhibitor of metalloproteinase 1	Timp1	-0.07	0.10	-1.29	1.25	0.00988
1449335_at	tissue inhibitor of metalloproteinase 3	Timp3	0.43	0.84	0.27	-1.53	0.00613
1417262_at	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	Ptgs2	-0.64	-0.16	-0.75	1.55	0.00205

Tabla A4
371 sondas sobreexpresadas en los tumores de los ratones *Trp53*^{ACE} y *Rb*^{ACE};*Trp53*^{ACE}

Probesets ID	Nº de veces que aumenta la expresión respecto a piel control	Símbolo del gen
1449254_at	62.31	Spp1
1424046_at	19.70	Bub1
1417541_at	16.23	Hells
1443621_at	16.22	Fbxo39
1445226_at	15.94	BC023969
1424292_at	14.88	Depdc1a
1429295_s_at	14.63	Trip13
1429734_at	14.63	4632434I11Rik
1452242_at	13.76	Cep55
1449578_at	13.62	Supt16h

1416757_at	12.86	Zwilch
1424454_at	12.53	Tmem87a
1438403_s_at	12.30	---
1448754_at	12.23	LOC100045055 /// Rbp1
1438824_at	12.11	Slc20a1
1418569_at	12.04	Fblim1
1450886_at	12.03	Gsg2
1449699_s_at	11.46	C330027C09Rik
1452458_s_at	11.21	Ppil5
1450677_at	11.15	Chek1
1417019_a_at	11.14	Cdc6
1429171_a_at	10.91	Ncapg
1419513_a_at	10.76	Ect2
1426165_a_at	10.57	Casp3
1439040_at	10.29	Cenpe
1424278_a_at	10.08	Birc5
1424511_at	9.61	Aurka
1450156_a_at	9.36	Hmmr
1425908_at	9.10	Gnb1
1455878_at	8.98	2700023E23Rik
1450496_a_at	8.74	2810433K01Rik
1452912_at	8.63	2600005O03Rik
1434767_at	8.59	C79407
1448568_a_at	8.56	Slc20a1
1456653_a_at	8.56	Mthfd1l
1429642_at	8.37	Anubl1
1419943_s_at	8.30	Ccnb1
1453589_a_at	8.26	6820431F20Rik
1439377_x_at	8.26	Cdc20
1419029_at	8.19	Ero1l
1436723_at	8.18	Cenpi
1429527_a_at	8.14	LOC433328 /// LOC677340 /// Plscr1
1424971_at	8.09	Ccdc99
1452115_a_at	8.09	Plk4
1439695_a_at	8.04	Mphosph1
1428104_at	7.86	Tpx2
1421546_a_at	7.85	Racgap1
1418334_at	7.83	Dbf4
1455488_at	7.81	6230416J20Rik
1448314_at	7.80	Cdc2a
1451358_a_at	7.78	Racgap1
1416258_at	7.77	Tk1
1418281_at	7.77	Rad51
1422430_at	7.72	Figl1
1460247_a_at	7.69	Skp2
1452314_at	7.68	Kif11
1429172_a_at	7.55	Ncapg
1432538_a_at	7.46	Rfc3
1448205_at	7.43	Ccnb1 /// Ccnb1-rs1
1424629_at	7.40	Brca1
1455160_at	7.39	2610203C20Rik
1450920_at	7.35	Ccnb2
1451920_a_at	7.22	Rfc1
1424143_a_at	7.15	Cdt1
1453181_x_at	7.14	Plscr1
1452954_at	7.07	Ube2c
1453107_s_at	6.98	4933413G19Rik /// Foxm1 /// Pebp1
1417139_at	6.97	Dsn1
1437187_at	6.96	E2f7 /// LOC639365
1447363_s_at	6.90	Bub1b
1429244_at	6.85	2610524H06Rik
1429156_at	6.84	2610036L11Rik

1424144_at	6.75	Cdt1
1417458_s_at	6.73	Cks2 /// LOC100039474 /// LOC100044750 /// LOC100044764
1422028_a_at	6.64	Ets1
1437033_a_at	6.58	Skp2
1437251_at	6.51	Cdca2
1436808_x_at	6.47	Mcm5
1415811_at	6.47	Uhrf1
1423524_at	6.47	Mastl
1429660_s_at	6.41	Smc2
1445824_at	6.40	Zfp458
1416514_a_at	6.36	Fscn1
1456857_at	6.36	1500011B03Rik
1440882_at	6.35	Lrp8
1417911_at	6.34	Ccna2
1454694_a_at	6.33	Top2a
1435005_at	6.33	Cenpe
1426002_a_at	6.28	Cdc7
1416664_at	6.27	Cdc20
1430574_at	6.26	Cdkn3
1416309_at	6.26	Nusap1
1423520_at	6.24	Lmnbl
1417910_at	6.21	Ccna2
1450842_a_at	6.20	Cenpa
1433893_s_at	6.20	Spag5
1416575_at	6.17	Cdc45l
1437370_at	6.15	Sgol2
1435575_at	6.14	Kntc1
1418969_at	6.12	Skp2
1448627_s_at	6.12	Pbk
1452040_a_at	6.11	Cdca3
1435135_at	6.10	Aadacl1
1422663_at	6.08	Orc1l
1450157_a_at	6.07	Hmmr
1422460_at	6.03	Mad2l1
1423809_at	5.97	Tcf19
1451928_a_at	5.94	Rad18
1460378_a_at	5.92	Tes
1452305_s_at	5.91	Cenpn
1439436_x_at	5.89	Incenp
1428543_at	5.87	Ppat
1417457_at	5.84	Cks2 /// LOC100039474 /// LOC100044764
1453775_at	5.84	4921505C17Rik
1437658_a_at	5.81	Snhg1
1435306_a_at	5.80	Kif11
1419838_s_at	5.79	Plk4
1426652_at	5.78	LOC100045677 /// Mcm3
1436707_x_at	5.76	Ncaph
1458585_at	5.74	---
1451346_at	5.72	Mtap
1456280_at	5.71	Clspn
1448635_at	5.68	Smc2
1436708_x_at	5.67	Mcm4
1458586_at	5.66	---
1423774_a_at	5.62	Prc1
1448650_a_at	5.62	Pole
1424991_s_at	5.61	Tyms /// Tyms-ps
1433408_a_at	5.59	Mcm10
1417506_at	5.53	Gmnn
1448953_at	5.51	Blm
1439510_at	5.50	Sgol1
1445427_at	5.49	D11Ert80e

1424118_a_at	5.47	Spc25
1429294_at	5.45	Trip13
1428304_at	5.45	Esco2
1452226_at	5.45	LOC100047340 /// Rec2
1427541_x_at	5.44	Hmmr
1433892_at	5.42	Spag5
1422016_a_at	5.41	Cenph
1416961_at	5.40	Bub1b
1460403_at	5.34	Psip1
1423700_at	5.32	Rfc3
1436847_s_at	5.31	Cdca8
1449060_at	5.29	Kif2c /// LOC631653
1455355_at	5.29	6030408C04Rik
1425815_a_at	5.29	Hmmr
1428481_s_at	5.26	Cdca8
1416698_a_at	5.26	Cks1b
1417587_at	5.22	Timeless
1421284_at	5.21	Pign
1460353_at	5.20	Tmem48
1417445_at	5.19	Ndc80
1436174_at	5.18	Atad2
1424766_at	5.16	Ercc6l
1430193_at	5.16	Casc5
1423318_at	5.14	Rad18
1427147_at	5.14	F730047E07Rik
1423310_at	5.09	Tpbp
1422768_at	5.07	Synerip
1426569_a_at	4.99	Frk
1417705_at	4.99	LOC100046081 /// Otub1
1450862_at	4.92	Rad54l
1423877_at	4.88	Chaf1b
1453189_at	4.87	Ube2i
1453745_at	4.87	2700038G22Rik
1422513_at	4.85	Ccnf
1453683_a_at	4.84	Cep55
1422979_at	4.82	Suv39h2
1435597_at	4.78	Atad5
1451128_s_at	4.75	Kif22
1437716_x_at	4.75	Kif22
1429270_a_at	4.75	Syce2
1449140_at	4.72	Nudcd2
1438750_at	4.70	Atrx
1422054_a_at	4.63	Skil
1431235_at	4.55	1110061A14Rik
1415859_at	4.52	Eif3c
1420707_a_at	4.48	Traip
1454744_at	4.46	F630043A04Rik
1422706_at	4.42	Tmepai
1451602_at	4.42	Snx6
1451839_a_at	4.39	Pde7a
1451246_s_at	4.39	Aurkb
1419130_at	4.39	Adat2
1423417_at	4.35	Smarcc1
1450692_at	4.33	Kif4
1452983_at	4.31	Cep57
1428518_at	4.30	Mif1ip
1429121_at	4.26	Spopl
1445689_at	4.26	---
1434079_s_at	4.24	Mcm2
1443962_at	4.19	1110029I05Rik /// Tfdp2
1427141_at	4.17	2700099C18Rik
1452917_at	4.16	Rfc5

1449661_at	4.12	Suz12
1420909_at	4.12	Vegfa
1424107_at	4.10	Kif18a
1427379_at	4.09	---
1428480_at	4.08	Cdca8
1439095_at	4.08	Sfrs11
1418227_at	4.06	Orc2l
1422462_at	4.05	Ube2t
1436222_at	4.05	Gas5
1458007_at	4.04	Myo1b
1434748_at	4.01	Ckap2
1426612_at	3.94	Tipin
1433242_at	3.94	5830415B17Rik
1451417_at	3.93	Brca1
1438076_at	3.91	Rpl30
1415860_at	3.89	Kpna2 /// LOC100039592 /// LOC100043906 /// LOC100046251
1423620_at	3.89	Cenpq
1448140_at	3.88	Ciapin1
1453226_at	3.88	3000004C01Rik
1459350_at	3.85	---
1440314_at	3.84	---
1432393_a_at	3.84	Thg1l
1448191_at	3.81	Plk1
1433966_x_at	3.80	Asns
1425166_at	3.80	Rbl1
1457744_at	3.78	Ddx46
1416031_s_at	3.78	Mcm7
1452241_at	3.77	Topbp1
1423525_at	3.75	Mastl
1446838_at	3.71	Atad1
1460448_s_at	3.71	Ttc14
1456032_x_at	3.69	EC666634 /// H2afz
1428968_at	3.69	Cep57
1460447_at	3.67	Pus7l
1421731_a_at	3.66	Fen1
1455834_x_at	3.66	Tacc3
1423714_at	3.65	Asf1b
1440498_at	3.65	---
1442109_at	3.64	---
1428593_at	3.63	1700029F09Rik
1428727_at	3.63	Cep192
1436728_s_at	3.62	Rtel1
1416563_at	3.59	Ctps
1454703_x_at	3.56	Snhg1
1454952_s_at	3.53	Ncapd3
1438673_at	3.50	Slc4a7
1420081_s_at	3.50	D2Ertd750e
1428483_a_at	3.49	2610039C10Rik
1422027_a_at	3.47	Ets1
1437549_at	3.47	2810408I11Rik
1429326_at	3.46	Cenpl
1455905_at	3.45	2610507B11Rik
1427437_at	3.43	---
1439266_a_at	3.43	Polr3k
1438051_at	3.42	Ttc14
1460677_at	3.40	Spats2
1419076_a_at	3.36	Brca2
1452258_at	3.34	Phf20
1434316_at	3.33	Chsy1 /// LOC100047167
1426554_a_at	3.33	Pgam1
1426739_at	3.33	Donson

1430147_a_at	3.32	Josd3
1427404_x_at	3.32	EG433182 /// Eno1 /// LOC100044223 /// LOC100045967 /// LOC100047043 /// LOC100047882
1425197_at	3.32	Ptpn2
1460672_at	3.31	2410002F23Rik
1436349_at	3.26	2700094K13Rik
1416962_at	3.26	Rcc1
1457081_at	3.24	D630038D15Rik
1457669_x_at	3.23	Rfc2
1438434_at	3.21	Arhgap11a
1429895_at	3.20	2310010G23Rik
1431506_s_at	3.19	EG665989 /// LOC433064 /// LOC629952 /// LOC666411 /// Ppih
1449877_s_at	3.15	Kifc1 /// LOC100042970 /// LOC100044006 /// LOC100044746
1429658_a_at	3.15	Smc2
1432013_a_at	3.13	2610016C23Rik
1430271_x_at	3.13	Josd3 /// LOC666781
1424136_a_at	3.12	EG665989 /// EG667598 /// LOC433064 /// LOC624822 /// Ppih
1440391_at	3.11	LOC638038
1424300_at	3.10	Gemin6
1429810_at	3.10	4921505C17Rik
1459957_at	3.10	---
1415878_at	3.10	Rrm1
1419023_x_at	3.09	EG433182 /// Eno1 /// LOC100044223 /// LOC100045967 /// LOC100047043 /// LOC100047882
1435057_x_at	3.09	Polr1e
1436247_at	3.07	Ints2
1441931_x_at	3.07	Gss
1424142_at	3.07	Ikbkap
1424156_at	3.07	Rbl1
1452454_at	3.05	Sdad1
1440875_a_at	3.05	Rsad1
1429395_at	3.05	Gstcd
1418566_s_at	3.04	Nudcd2
1459307_at	3.03	---
1440553_at	3.02	Mecr
1429048_at	3.00	Bloc1s2
1423919_at	3.00	BC023882
1439394_x_at	3.00	Cdc20
1440972_at	2.96	Nsd1
1418335_a_at	2.95	Dph1 /// RP23-143A14.5
1427105_at	2.95	Cenpn
1450983_at	2.91	Akap8
1415913_at	2.90	EG625298 /// EG628061 /// LOC100039924 /// LOC100043695 /// LOC100044992 /// LOC100048340 /// LOC100048495 /// LOC637251 /// LOC668239 /// Rps13
1429665_at	2.90	6230416J20Rik
1419022_a_at	2.89	EG433182 /// Eno1 /// LOC100044223 /// LOC100045967 /// LOC545568
1426609_at	2.88	Dis3
1455726_at	2.88	Gm71 /// LOC100048447
1417351_a_at	2.87	LOC100047155 /// Snrpa1
1457509_at	2.85	Sbno1
1430987_s_at	2.84	Wbp11
1456541_x_at	2.84	Atad3a
1426447_at	2.83	Nup35
1449200_at	2.82	Nup155
1455218_at	2.82	6330503K22Rik
1418906_at	2.79	Nubp1
1437497_a_at	2.78	Hsp90aa1
1459371_at	2.78	---
1452635_x_at	2.77	Josd3
1429242_at	2.77	1110054O05Rik

1416801_at	2.75	Trpm7
1435451_at	2.74	Hel308
1438053_at	2.73	Tfg
1445169_at	2.66	---
1416448_at	2.66	Itpa
1417125_at	2.66	Ahcy
1426797_at	2.66	2700094F01Rik
1426676_s_at	2.66	Tomm70a
1434692_at	2.66	1110034B05Rik
1452612_at	2.63	Zfp294
1439270_x_at	2.62	LOC100045999 /// LOC640204 /// Ran
1452836_at	2.59	Lpin2
1436848_x_at	2.58	Impa1
1434317_s_at	2.55	Tex10
1453314_x_at	2.54	2610039C10Rik
1436930_x_at	2.52	EG623818 /// Hmbs
1424589_s_at	2.52	Rnpc3
1426327_s_at	2.51	Zfp91 /// Zfp91-ctnf
1427269_at	2.51	Sfrs11
1426839_at	2.49	Pold3
1455818_at	2.49	4930427A07Rik
1417095_a_at	2.45	Hspa14
1436209_at	2.45	Dnajc16
1434660_at	2.44	Alkbh1
1455185_s_at	2.44	Phf16
1426469_a_at	2.43	Tbp
1425460_at	2.43	Mtmr2
1451163_at	2.41	Tinf2
1437565_a_at	2.39	Gnl2 /// LOC633966
1448855_at	2.37	Rassf1
1443988_at	2.34	Rbm39
1417681_at	2.33	Nudt21
1437457_a_at	2.32	Mtpn
1456730_x_at	2.31	Actl6a
1436454_x_at	2.27	Fen1
1423303_at	2.23	Paxip1
1436022_at	2.21	Endogl1
1451641_at	2.21	Dbr1
1423826_at	2.20	Noc4l
1424119_at	2.18	Prkab1
1454968_at	2.17	1110034A24Rik
1446007_at	2.17	---
1433960_at	2.16	Isg2012
1426386_at	2.16	Rpl7l1
1416048_at	2.15	Phc2
1451408_at	2.12	Trub2
1421122_at	2.12	Cbll1
1439464_s_at	2.12	Tex10
1433567_at	2.10	Gmps
1426548_a_at	2.08	Atpbd4
1441737_s_at	2.06	Rassf1
1421906_at	1.94	Med1
1442106_at	1.87	Fancm
1440061_at	1.86	Rbx1
1428248_at	1.81	Nfx1
1426836_s_at	1.78	Metap1
1426854_a_at	1.75	BC085271 /// LOC100047898 /// Set
1454818_at	1.70	Gmeb2

Tabla A5
311 sondas reprimidas en los tumores de los ratones *Trp53^{ACE}* y *Rb^{ACE}*; *Trp53^{ACE}*

Probesets ID	Nº de veces que disminuye la expresión respecto a piel control	Símbolo del gen
1417464_at	-300.83	Tnnc2
1450118_a_at	-261.96	Tnnt3
1433923_at	-230.95	Krt77
1417653_at	-229.18	Pvalb
1422651_at	-227.02	Adipoq
1427520_a_at	-223.00	Myh1
1419312_at	-218.04	Atp2a1
1427445_a_at	-217.89	Ttn
1452651_a_at	-216.69	Myl1
1427446_s_at	-215.16	Ttn
1455736_at	-200.78	Mybpc2
1417867_at	-197.77	Cfd
1449434_at	-196.01	Car3
1417614_at	-191.48	Ckm
1418155_at	-178.78	Myot
1448602_at	-166.36	Pygm
1418095_at	-160.98	Smpx
1428722_at	-160.83	Ckmt2
1435355_at	-151.06	Neb
1460256_at	-146.79	Car3
1457435_x_at	-144.78	Myom2
1429565_s_at	-133.24	Lce1m
1417889_at	-129.59	Apobec2
1448371_at	-129.23	Mylpf
1416889_at	-117.31	Tnni2
1426144_x_at	-113.16	Trdn
1455645_at	-101.46	8030451F13Rik
1427735_a_at	-100.34	Acta1
1427306_at	-95.82	Ryr1
1416752_at	-95.36	Ldb3
1415994_at	-95.07	Cyp2e1
1420693_at	-91.31	Myom1
1424737_at	-90.93	Thrsp
1448327_at	-86.91	Actn2
1418677_at	-83.31	Actn3
1428899_at	-76.55	Tmem182
1438936_s_at	-75.96	Ang
1449500_at	-75.11	Serpinb7
1427312_at	-74.54	Cmya5
1448792_a_at	-74.50	Cyp2f2
1426143_at	-72.26	Trdn
1417951_at	-70.41	Eno3
1451203_at	-69.86	Mb
1426142_a_at	-62.88	Trdn
1422644_at	-61.60	LOC100045042 /// Sh3bgr
1449356_at	-61.10	Asb5
1449015_at	-59.22	Retnla
1436453_at	-57.57	BB144871
1418373_at	-56.62	Pgam2
1435813_at	-55.63	Mypn
1449218_at	-54.63	Cox8b
1460202_at	-53.22	Myoz1
1450917_at	-53.14	Myom2
1433783_at	-52.09	Ldb3
1444494_at	-49.97	Kbtbd10
1452345_at	-49.80	Lmod2
1433532_a_at	-49.18	Mbp
1435370_a_at	-48.47	Ces3

1452879_at	-47.86	Synpo2
1449398_at	-46.63	Rpl3l
1417273_at	-46.56	Pdk4
1456508_at	-46.50	A030001H23Rik
1447870_x_at	-46.34	1110002E22Rik
1449969_at	-46.09	Tmod4
1423477_at	-44.86	Zic1
1419056_at	-44.74	Rtn2
1460318_at	-44.08	Csrp3
1452260_at	-43.88	Cidec
1416468_at	-41.04	Aldh1a1
1417626_at	-40.91	Pde4dip
1417607_at	-40.34	Cox6a2
1418709_at	-39.46	Cox7a1
1439658_at	-38.02	Lmod3
1421253_at	-37.61	Nrap
1438937_x_at	-36.14	Ang
1441667_s_at	-34.87	Smyd1
1423145_a_at	-34.75	Tcap
1449178_at	-34.15	Pdlim3
1438609_x_at	-34.11	Tnni2
1436332_at	-33.69	Hspb6
1436867_at	-33.07	Srl
1420442_at	-32.14	Cacna1s
1434893_at	-31.82	Atp1a2
1426731_at	-31.52	Des
1447657_s_at	-30.98	Synpo2l
1450798_at	-30.76	Tnxb
1416023_at	-29.76	Fabp3
1438467_at	-28.75	Mgl2
1438175_x_at	-28.30	Myom2
1448842_at	-27.00	Cdo1
1429223_a_at	-26.95	Hfe2
1420582_at	-26.86	Cd209e
1416455_a_at	-26.78	Cryab
1418769_at	-26.08	Myoz2
1418595_at	-25.89	S3-12
1429463_at	-25.59	Prkaa2
1451372_a_at	-25.58	Art1
1459030_at	-25.22	Bbox1
1421092_at	-25.01	Serpina12
1456228_x_at	-24.46	Mbp
1419618_at	-23.88	Bbox1
1417765_a_at	-23.64	Amy1
1419739_at	-23.18	Tpm2
1434449_at	-23.09	Aqp4
1421374_a_at	-22.90	Fxyd1
1418601_at	-22.63	Aldh1a7
1427867_at	-22.58	---
1443997_at	-22.06	Gprin2
1443906_at	-21.84	Cd55
1418314_a_at	-21.79	A2bp1
1422153_a_at	-21.74	Asb11
1426172_a_at	-21.73	Cd209a
1425275_at	-21.37	Asph
1416225_at	-21.31	Adh1
1423238_at	-21.16	Itgb1bp2
1434008_at	-21.16	Scn4b
1449383_at	-20.93	Adssl1
1427371_at	-20.85	Abca8a
1434766_at	-19.99	---
1427465_at	-19.64	Atp1a2
1419646_a_at	-19.50	Mbp
1449081_at	-19.50	Ces3
1419145_at	-19.04	Smtnl1

1419440_at	-18.81	Trim54
1443783_x_at	-18.75	H2-Aa
1453059_at	-17.76	2310046A06Rik
1417025_at	-17.57	H2-Eb1
1424177_at	-17.48	Tmem38a
1426183_a_at	-17.18	Cd209d
1418062_at	-17.02	Eef1a2
1436201_x_at	-16.87	Mbp
1419150_at	-16.19	Myf6
1434927_at	-15.86	Hspb7
1417979_at	-15.56	Tnmd
1418697_at	-15.28	Inmt
1424531_a_at	-15.21	Tcea3
1455466_at	-14.92	Gpr133
1449918_at	-14.84	Cd209g
1423405_at	-14.77	Timp4
1435399_at	-14.53	2310068J10Rik
1416780_at	-14.41	Pfkm
1452590_a_at	-14.30	LOC100039175 /// LOC100039246 /// Plac9
1449466_at	-13.75	Clec3b
1460591_at	-13.68	Esr1
1455610_at	-13.56	Dmn
1450884_at	-13.52	Cd36
1424393_s_at	-13.48	Adhfe1
1448507_at	-13.23	Efh1
1436939_at	-13.23	Unc45b
1454651_x_at	-13.22	Mbp
1448926_at	-12.94	Hoxa5
1435371_x_at	-12.89	Ces3
1439505_at	-12.81	Clic5
1449577_x_at	-12.77	Tpm2
1448154_at	-12.18	Ndr2
1420551_at	-11.80	2310039E09Rik
1448249_at	-11.73	Gpd1
1425505_at	-11.27	Mylk
1423253_at	-11.00	Mpz
1435312_at	-10.99	Paqr7
1418028_at	-10.96	Dct
1449396_at	-10.86	Aoc3
1456895_at	-10.79	Cd209b
1460674_at	-10.76	Paqr7
1448962_at	-10.73	Myh11
1460242_at	-10.68	Cd55
1436098_at	-10.50	Bche
1416697_at	-10.37	Dpp4
1451322_at	-10.37	Cmb1
1456741_s_at	-10.22	Gpm6a
1417168_a_at	-10.12	Usp2
1460012_at	-10.01	Wfdc3
1429236_at	-9.99	Galnt12
1436044_at	-9.83	Scn7a
1449971_a_at	-9.80	Cd209f
1438431_at	-9.49	Abcd2
1429783_at	-9.36	Pdlim5
1451969_s_at	-9.24	Parp3
1421254_a_at	-9.22	Sgcl
1425677_a_at	-9.10	Ank1
1448825_at	-8.88	Pdk2
1417066_at	-8.87	Cabcl
1449088_at	-8.86	Fbp2
1433720_s_at	-8.71	Ndg2
1427201_at	-8.58	Mustn1
1442226_at	-8.43	Sema3e
1419687_at	-8.36	Macrocl
1426157_a_at	-8.35	Cd209b

1429598_at	-8.26	2310042D19Rik
1433727_at	-8.00	BC038479
1418762_at	-7.85	Cd55
1441551_at	-7.72	Mypn
1418952_at	-7.71	Txlnb
1425243_at	-7.69	Cd207
1436737_a_at	-7.66	Sorbs1
1421144_at	-7.48	Rpgrip1
1442769_at	-7.41	8030451F13Rik
1416007_at	-7.34	Satb1
1425826_a_at	-7.09	Sorbs1
1450723_at	-7.08	Isl1
1422654_at	-6.89	Sgca
1432517_a_at	-6.85	Nnmt
1428471_at	-6.77	Sorbs1
1447946_at	-6.60	Adam23
1418395_at	-6.56	Slc47a1
1417027_at	-6.42	Trim2
1435446_a_at	-6.36	Chptl
1418086_at	-6.27	Ppp1r14a
1429808_at	-6.23	1110020C03Rik
1418100_at	-6.16	A030009H04Rik
1417787_at	-6.11	Dkk1l
1434786_at	-6.08	Ppp1r12b
1457031_at	-6.05	Fsd2
1453289_at	-6.04	Eif2c4
1459646_at	-6.01	Hs3st6
1435272_at	-5.98	Itpkb
1439708_at	-5.91	Myom3
1435663_at	-5.68	Esr1
1425274_at	-5.65	Asph
1438698_at	-5.47	Tmem132c
1418743_a_at	-5.47	LOC100047138 /// Tesc
1418804_at	-5.44	Sucnr1
1415958_at	-5.36	Slc2a4
1417169_at	-5.24	Usp2
1440859_at	-5.10	Akap6
1436987_at	-5.10	5430433G21Rik
1435870_at	-5.07	---
1416008_at	-5.03	Satb1
1424408_at	-5.03	Lims2
1450717_at	-4.98	Ang
1417680_at	-4.91	Kcna5
1456087_at	-4.80	Nfia
1453355_at	-4.78	Wnk2
1427177_at	-4.69	Fyco1
1430368_s_at	-4.61	1700019D03Rik
1419301_at	-4.61	Fzd4
1433628_at	-4.51	Coq10a
1421091_at	-4.49	Serpina12
1436224_at	-4.44	Kif1c
1427943_at	-4.44	Acyp2
1434756_at	-4.41	5430421B17
1455091_at	-4.40	3222402P14Rik
1454078_a_at	-4.34	Gal3st1
1426460_a_at	-4.21	Ugp2
1434511_at	-4.20	Phkb
1422245_a_at	-4.20	Mrvi1
1460244_at	-4.19	Upb1
1460123_at	-4.18	Gpr1
1419554_at	-4.17	Cd47
1424308_at	-4.16	Slc24a3
1450725_s_at	-4.15	Car14
1430979_a_at	-4.11	Prdx2
1451326_at	-4.11	Abhd14b

1437211_x_at	-4.04	Elov15
1453486_a_at	-3.86	Scube2
1423860_at	-3.85	Ptgds
1455739_at	-3.81	EG245190
1436841_at	-3.77	B230380D07Rik
1453749_at	-3.74	2610507I01Rik
1420827_a_at	-3.74	Ccng1
1419054_a_at	-3.70	Ptpn21
1449620_s_at	-3.62	D16Wsu65e
1420444_at	-3.56	Slc22a3
1433557_at	-3.48	Cbx7
1452714_at	-3.46	Tanc1
1454171_x_at	-3.32	9530053H05Rik
1450017_at	-3.29	Ccng1
1444998_at	-3.27	---
1452929_at	-3.27	Clip1
1460213_at	-3.25	Golga4
1456569_x_at	-3.24	Gsn
1434454_at	-3.20	D16Wsu65e
1416838_at	-3.19	Mut
1453752_at	-3.04	Rpl17
1448491_at	-3.00	Ech1
1416816_at	-2.98	Nek7
1457724_at	-2.92	Ctsl
1421867_at	-2.91	Nr3c1
1428464_at	-2.89	Ndufa3
1442508_at	-2.89	4933404M19Rik
1419179_at	-2.89	Txn14a
1447882_x_at	-2.88	Ddx54
1423859_a_at	-2.86	Ptgds
1452790_x_at	-2.82	Ndufa3
1436621_at	-2.73	LOC100047169 /// RP23-157O10.7
1415966_a_at	-2.57	Ndufv1
1436338_at	-2.53	---
1434485_a_at	-2.49	Ugp2
1422731_at	-2.45	Limd1
1451312_at	-2.44	Ndufs7
1416425_at	-2.41	Pex19
1435113_x_at	-2.40	Stmn3
1423498_at	-2.38	Aldoart2
1451999_at	-2.32	Ldb3
1439688_at	-2.31	Fbln1
1452055_at	-2.25	Ctdsp1 /// LOC100047249
1415984_at	-2.23	Acadm
1435008_at	-2.23	Slc9a6
1456385_x_at	-2.19	Ubxd3
1418954_at	-2.09	Camkk1
1424280_at	-1.90	Mospd1
1441923_s_at	-1.90	Edn3
1443503_at	-1.88	Ihpk3
1445558_at	-1.85	5930430L01Rik
1436102_at	-1.80	Sec22c
1422908_at	-1.79	Atp1b4
1432635_a_at	-1.73	Tloc1
1459260_at	-1.69	---
1419510_at	-1.60	Es22

Tabla A6
Solapamientos significativos de los genes sobreexpresados en los tumores de ratón con firmas de cáncer humano

Tipo de análisis (1)	Group ID SEQ (2)	Firma de Oncomine	Solapamiento (3)	p-val (4)
Mutación en <i>Tp53</i>	75550987	Breast Carcinoma p53 Mutation Status - Top 5% over-expressed in Mutant (Miller)	100	1.1E-68
	75581877	Breast Carcinoma p53 Mutation Status - Top 10% over-expressed in Mutant (Sorlie)	39	3.8E-11
	75590407	Breast CellLine TP53 Mutation Status - Top 10% over-expressed in Mutant (Neve)	45	1.3E-05
	75549887	Bladder Carcinoma p53 Mutation Status - Top 5% over-expressed in Mutant (Lindgren)	45	6.6E-25
	75590187	Ovarian Endometrioid Adenocarcinoma p53 Mutation - Top 10% over-expressed in Positive (Hendrix)	61	1.2E-12
	75582567	Mantle Cell Lymphoma p53 Deletion - Top 10% over-expressed in Positive (Rosenwald)	31	2.5E-07
Malignidad	75586817	Astrocytoma Survival - 5 Years - Top 10% over-expressed in Dead (Phillips)	130	2.5E-55
	75592007	Glioma Survival After Surgical Resection - 5 Years - Top 10% over-expressed in Dead (French)	87	3.3E-22
	75513197	Glioblastoma Multiforme Survival - 1 Year - Top 1% over-expressed in Dead (Liang)	21	4.3E-17
	75584177	Glioma Survival - 3 Years - Top 10% over-expressed in Dead (Freije)	68	5.8E-12
	7558497	Glioblastoma Survival - 3 Years - Top 5% over-expressed in Dead (Nutt)	31	5.0E-11
	75584227	Brain Survival - 3 Years - Top 10% over-expressed in Dead (Shai)	37	6.6E-07
	75584207	Medulloblastoma Survival - 5 Years - Top 10% over-expressed in Dead (Pomeroy)	24	4.7E-05
	75554927	Breast Carcinoma Disease-Free Survival - 5 Years - Top 5% over-expressed in Dead (Ivshina)	85	2.7E-51
	75586827	Breast Carcinoma Survival - 5 Years - Top 10% over-expressed in Dead (Pawitan)	120	1.5E-46
	7558477	Breast Carcinoma Survival - 5 Years - Top 5% over-expressed in Dead (vandeVijver)	84	1.5E-45
	75596067	Breast Carcinoma Disease-Free Survival - 5 Years - Top 10% over-expressed in Dead (Desmedt)	80	2.9E-24
	75595117	Breast Carcinoma Survival - 5 Years - Top 10% over-expressed in Dead (Bild)	44	1.6E-10
	75547507	Breast Ductal Carcinoma Survival - 5 Years - Top 5% over-expressed in Dead (Sotiriou)	20	4.1E-07
	75587847	Multiple Myeloma Survival - 3 Years - Top 10% over-expressed in Dead Of Disease (Zhan)	112	8.5E-40
	75590217	Multiple Myeloma Survival - 1 Year - Top 10% over-expressed in Dead (Carrasco)	72	7.9E-14
	75582967	Papillary Renal Cell Carcinoma Survival - 5 Years - Top 5% over-expressed in Dead (Yang)	70	1.7E-29
	75595877	Clear Cell Renal Cell Carcinoma Survival - 5 Years - Top 10% over-expressed in Dead (Zhao)	75	8.1E-20
	77311267	Mantle Cell Lymphoma Survival - 5 Years - Top 10% over-expressed in Dead (Rosenwald)	48	3.5E-19
	75592967	Bladder Carcinoma Survival - 5 Years - Top 10% over-expressed in Dead (Blaveri)	49	2.0E-16
	75588427	Ewings Sarcoma Survival - 5 Years - Top 10% over-expressed in Dead (Ohali)	24	5.4E-06
	75594157	Acute Myeloid Leukemia Survival - 3 Years - Top 10% over-expressed in Dead (Heuser)	42	1.5E-04

1. **Mutación en *Tp53***: Muestras de cánceres con el gen *Tp53* mutado. **Malignidad**: Muestras de cáncer de pacientes fallecidos
2. Identificador de las firmas de expresión génica en "Oncomine"
3. Genes comunes entre los genes sobreexpresados en los tumores de ratón y cánceres humanos
4. Significancia del solapamiento

Tabla A7
MicroARNs diferencialmente expresados en muestras tumorales murinas

Nombre del microARN	Variación en la expresión respecto a piel control	p-val
hsa-miR-421/mmu-miR-421	0.66	1.289E-03
hsa-miR-324-3p/mmu-miR-324-3p/rno-miR-324-3p	0.67	7.970E-04
mmu-miR-501-5p/rno-miR-501	0.67	1.805E-03
hsa-miR-32/mmu-miR-32/rno-miR-32	0.67	2.069E-03
mmu-miR-186*	0.67	7.190E-04
hsa-miR-132*	0.67	6.840E-04
hsa-miR-506	0.67	6.680E-04
hsa-miR-519c-5p/hsa-miR-519b-5p/hsa-miR-523*/hsa-miR-518e*/hsa-miR-522*/hsa-miR-519a*	0.67	7.230E-04
hsa-miR-518b	0.67	6.330E-04
hsa-miR-335*/mmu-miR-335-3p	0.67	7.670E-04
hsa-miR-421/mmu-miR-421	0.68	5.800E-04
mmu-miR-711	0.68	1.446E-03
hsa-miR-580	0.68	8.080E-04
hsa-miR-578	0.68	5.450E-04
mmu-miR-669b	0.68	5.690E-04
hsa-miR-208/mmu-miR-208/rno-miR-208	0.68	5.540E-04

rno-miR-742	0.68	8.910E-04
mmu-miR-191*	0.68	4.860E-04
hsa-miR-135b/mmu-miR-135b/rno-miR-135b	0.68	5.630E-04
hsa-miR-615-5p/mmu-miR-615-5p	0.68	6.980E-04
hsa-miR-29a*/mmu-miR-29a*/rno-miR-29a*	0.68	1.532E-03
hsa-miR-132*	0.69	5.970E-04
mmu-miR-20a*/rno-miR-20a*	0.69	7.850E-04
hsa-miR-766	0.69	5.220E-04
hsa-miR-522	0.69	4.570E-04
hsa-miR-208/mmu-miR-208/rno-miR-208	0.69	3.860E-04
hsa-miR-659	0.69	4.270E-04
rno-miR-664	0.69	4.350E-04
rno-miR-333	0.69	4.000E-04
hsa-miR-518f*	0.69	3.660E-04
hsa-miR-611	0.70	4.080E-04
hsa-miR-520a-5p	0.70	3.900E-04
hsa-miR-618	0.70	7.130E-04
hsa-miR-625*	0.70	3.820E-04
hsa-miR-616*	0.70	3.890E-04
mmu-miR-872*/rno-miR-872*	0.70	3.380E-04
hsa-miR-599	0.70	5.040E-04
mmu-miR-598/rno-miR-598-3p	0.70	3.710E-04
rno-miR-450a	0.70	1.341E-03
hsa-miR-135b/mmu-miR-135b/rno-miR-135b	0.70	9.230E-04
mmu-miR-804	0.70	3.440E-04
hsa-miR-361-3p	0.70	5.410E-04
rno-miR-742	0.70	4.690E-04
hsa-miR-105	0.70	2.009E-03
hsa-miR-581	0.70	3.120E-04
hsa-miR-301b	0.70	3.180E-04
hsa-miR-941	0.70	5.380E-04
hsa-miR-887	0.70	2.780E-04
hsa-miR-130a*	0.70	1.203E-03
hsa-miR-565	0.70	4.230E-04
hsa-miR-659	0.70	3.170E-04
hsa-miR-888*	0.70	2.990E-04
hsa-miR-888*	0.70	3.010E-04
hsa-miR-526a/hsa-miR-520c-5p/hsa-miR-518d-5p	0.71	2.640E-04
hsa-miR-328/mmu-miR-328/rno-miR-328	0.71	2.870E-04
hsa-miR-141*	0.71	2.870E-04
hsa-miR-455-5p/mmu-miR-455*/rno-miR-455	0.71	1.107E-03
mmu-miR-718	0.71	6.130E-04
hsa-miR-578	0.71	2.240E-04
rno-miR-347	0.71	2.680E-04
hsa-miR-200c*/mmu-miR-200c*	0.71	2.610E-04
mmu-miR-18b	0.71	2.930E-04
hsa-miR-520e	0.72	2.260E-04
mmu-miR-666-3p	0.72	5.920E-04
hsa-miR-593	0.72	2.610E-04

hsa-miR-643	0.72	1.790E-04
mmu-miR-878-3p	0.72	1.790E-04
hsa-miR-105	0.72	1.362E-03
hsa-miR-519c-5p/hsa-miR-519b-5p/hsa-miR-523*/hsa-miR-518e*/hsa-miR-522*/hsa-miR-519a*	0.72	1.770E-04
hsa-miR-708*/mmu-miR-708*/rno-miR-708*	0.72	2.970E-04
rno-miR-421	0.73	1.500E-04
hsa-miR-506	0.73	1.420E-04
hsa-miR-105	0.73	1.269E-03
hsa-miR-651	0.73	1.400E-04
hsa-miR-190/mmu-miR-190/rno-miR-190	0.73	3.940E-04
hsa-miR-7/mmu-miR-7a/rno-miR-7a	0.73	9.360E-04
hsa-miR-584	0.73	1.390E-04
hsa-miR-519c-5p/hsa-miR-519b-5p/hsa-miR-523*/hsa-miR-518e*/hsa-miR-522*/hsa-miR-519a*	0.73	1.500E-04
hsa-miR-582-5p	0.73	4.310E-04
hsa-miR-20a*	0.73	1.210E-04
rno-miR-421	0.73	1.850E-04
hsa-miR-7/mmu-miR-7a/rno-miR-7a	0.73	6.270E-04
hsa-miR-483-3p	0.74	1.510E-04
hsa-miR-625*	0.74	1.800E-04
hsa-miR-26b*/mmu-miR-26b*/rno-miR-26b*	0.74	1.140E-04
mmu-miR-483*/rno-miR-483	0.74	1.420E-04
hsa-miR-26a-1*	0.74	1.170E-04
hsa-miR-936	0.74	5.830E-04
hsa-miR-548b-3p	0.74	4.540E-04
hsa-miR-7/mmu-miR-7a/rno-miR-7a	0.74	4.560E-04
mmu-miR-715	0.74	1.080E-04
mmu-miR-191*	0.74	9.480E-05
mmu-miR-181a-2*	0.74	8.940E-05
hsa-miR-603	0.74	9.760E-05
hsa-miR-296-5p/mmu-miR-296-5p/rno-miR-296*	0.74	9.730E-05
hsa-miR-149*	0.74	5.240E-04
hsa-miR-651	0.74	9.750E-05
mmu-miR-670	0.74	7.740E-05
hsa-miR-522	0.74	6.550E-04
hsa-miR-623	0.75	1.110E-04
mmu-miR-711	0.75	3.040E-04
hsa-miR-377*	0.75	1.160E-04
hsa-miR-29a*/mmu-miR-29a*/rno-miR-29a*	0.75	2.200E-04
mmu-miR-878-3p	0.75	1.200E-04
hsa-miR-616*	0.75	9.410E-05
rno-miR-347	0.75	7.580E-05
rno-miR-878	0.75	9.060E-05
mmu-miR-483*/rno-miR-483	0.75	6.580E-05
mmu-miR-469	0.75	1.140E-04
hsa-miR-29a*/mmu-miR-29a*/rno-miR-29a*	0.75	1.580E-04
mmu-miR-501-5p/rno-miR-501	0.75	6.570E-05
mmu-miR-879*	0.75	6.550E-05
mmu-miR-711	0.75	1.890E-04
mmu-miR-291a-3p/rno-miR-291a-3p	0.75	8.090E-05

mmu-miR-686	0.76	8.070E-05
hsa-miR-520a-5p	0.76	5.830E-05
hsa-miR-516a-3p/hsa-miR-516b*	0.76	5.040E-05
hsa-miR-21/mmu-miR-21/rno-miR-21	0.76	4.940E-04
mmu-miR-872*/rno-miR-872*	0.76	5.080E-05
hsa-miR-483-3p	0.76	5.530E-05
hsa-miR-449a/mmu-miR-449a/rno-miR-449a	0.76	5.180E-05
hsa-miR-371-3p	0.76	1.520E-04
hsa-miR-122/mmu-miR-122/rno-miR-122	0.76	7.920E-05
mmu-miR-207/rno-miR-207	0.76	9.600E-05
hsa-miR-891b	0.76	1.460E-04
mmu-miR-686	0.76	4.060E-05
hsa-miR-19b/mmu-miR-19b/rno-miR-19b	0.77	1.780E-04
mmu-miR-466h	0.77	4.140E-05
mmu-miR-872*/rno-miR-872*	0.77	4.240E-05
mmu-miR-106a	0.77	4.140E-05
hsa-miR-220b	0.77	1.280E-04
hsa-miR-539/mmu-miR-539/rno-miR-539	0.77	1.640E-04
hsa-miR-302c/mmu-miR-302c	0.77	3.530E-05
hsa-miR-302c/mmu-miR-302c	0.77	4.750E-05
mmu-miR-872*/rno-miR-872*	0.77	4.650E-05
hsa-miR-190/mmu-miR-190/rno-miR-190	0.77	3.650E-05
hsa-miR-29a*/mmu-miR-29a*/rno-miR-29a*	0.77	1.900E-04
hsa-miR-603	0.77	3.330E-05
mmu-miR-670	0.77	4.190E-05
hsa-miR-592/mmu-miR-592	0.77	3.330E-04
hsa-miR-520g/hsa-miR-520h	0.78	3.280E-04
hsa-miR-296-5p/mmu-miR-296-5p/rno-miR-296*	0.78	6.460E-05
mmu-miR-878-3p	0.78	2.690E-05
hsa-miR-18b	0.78	3.110E-04
hsa-miR-373	0.78	2.800E-05
hsa-miR-516a-3p/hsa-miR-516b*	0.78	4.710E-05
hsa-miR-149*	0.78	1.650E-04
mmu-miR-302c*	0.78	3.630E-05
hsa-miR-455-5p/mmu-miR-455*/rno-miR-455	0.78	1.630E-04
hsa-miR-616*	0.78	2.750E-05
hsa-miR-18a/mmu-miR-18a/rno-miR-18a	0.78	1.490E-04
hsa-miR-888*	0.78	3.190E-05
hsa-miR-296-5p/mmu-miR-296-5p/rno-miR-296*	0.78	2.160E-05
hsa-miR-766	0.78	2.350E-05
hsa-miR-21/mmu-miR-21/rno-miR-21	0.78	3.810E-04
mmu-miR-290-5p/rno-miR-290	0.78	4.960E-05
hsa-miR-297/mmu-miR-297a	0.78	2.180E-05
hsa-miR-296-5p/mmu-miR-296-5p/rno-miR-296*	0.79	2.020E-05
hsa-miR-888*	0.79	2.130E-05
mmu-miR-677	0.79	1.730E-04
hsa-miR-21/mmu-miR-21/rno-miR-21	0.79	2.440E-04
hsa-miR-200c*/mmu-miR-200c*	0.79	1.660E-05
hsa-miR-340/mmu-miR-340-5p/rno-miR-340-5p	0.79	1.880E-05

hsa-miR-770-5p	0.79	2.940E-05
hsa-miR-135b/mmu-miR-135b/rno-miR-135b	0.79	8.370E-05
mmu-miR-718	0.79	8.260E-05
mmu-miR-712*	0.79	1.710E-05
hsa-miR-603	0.79	1.750E-05
hsa-miR-891b	0.79	1.010E-04
mmu-miR-450b-5p	0.80	1.960E-05
hsa-miR-605	0.80	1.980E-05
hsa-miR-21/mmu-miR-21/rno-miR-21	0.80	1.820E-04
hsa-miR-519c-5p/hsa-miR-519b-5p/hsa-miR-523*/hsa-miR-518e*/hsa-miR-522*/hsa-miR-519a*	0.80	1.220E-05
hsa-miR-106b/mmu-miR-106b/rno-miR-106b	0.80	2.950E-05
rno-miR-346	0.80	1.760E-05
hsa-miR-149*	0.80	6.720E-05
hsa-miR-19b/mmu-miR-19b/rno-miR-19b	0.80	5.860E-05
hsa-miR-220b	0.80	1.270E-05
hsa-miR-887	0.80	3.290E-05
hsa-miR-18a/mmu-miR-18a/rno-miR-18a	0.80	1.090E-04
hsa-miR-106b/mmu-miR-106b/rno-miR-106b	0.80	4.000E-05
hsa-miR-7/mmu-miR-7a/rno-miR-7a	0.81	4.000E-05
hsa-miR-190/mmu-miR-190/rno-miR-190	0.81	2.810E-05
hsa-miR-18a/mmu-miR-18a/rno-miR-18a	0.81	1.010E-04
hsa-miR-887	0.81	8.260E-06
hsa-miR-659	0.81	8.250E-06
hsa-miR-377*	0.81	9.240E-06
hsa-miR-603	0.81	7.810E-06
hsa-miR-570	0.81	8.730E-06
hsa-miR-335*/mmu-miR-335-3p	0.81	1.030E-05
mmu-miR-598/rno-miR-598-3p	0.81	1.130E-05
mmu-miR-715	0.81	7.760E-06
mmu-miR-207/rno-miR-207	0.81	2.320E-05
mmu-miR-677	0.81	9.400E-06
hsa-miR-361-3p	0.81	6.590E-06
mmu-miR-346	0.82	2.010E-05
hsa-miR-18b	0.82	5.100E-05
hsa-miR-571	0.82	1.040E-05
hsa-miR-618	0.82	4.330E-06
hsa-miR-487b/mmu-miR-487b/rno-miR-487b	0.82	2.180E-05
mmu-miR-345-3p/rno-miR-345-3p	0.82	6.440E-06
hsa-miR-634	0.82	4.710E-06
mmu-miR-290-5p/rno-miR-290	0.82	1.510E-05
hsa-miR-548d-3p	0.82	6.540E-06
mmu-miR-469	0.83	1.910E-05
hsa-miR-487b/mmu-miR-487b/rno-miR-487b	0.83	2.360E-05
mmu-miR-106a	0.83	1.210E-05
hsa-miR-15b*/mmu-miR-15b*	0.83	4.070E-06
hsa-miR-519e	0.83	3.290E-06
mmu-miR-290-5p/rno-miR-290	0.83	5.400E-06
hsa-miR-487b/mmu-miR-487b/rno-miR-487b	0.84	1.270E-05
mmu-miR-804	0.84	4.700E-06

mmu-miR-343	0.84	3.630E-06
mmu-miR-291a-3p/rno-miR-291a-3p	0.84	2.150E-06
hsa-miR-519e	0.84	1.620E-05
mmu-miR-290-5p/rno-miR-290	0.84	5.610E-06
mmu-miR-291a-3p/rno-miR-291a-3p	0.84	2.610E-06
mmu-miR-712*	0.84	5.510E-06
hsa-miR-453	0.84	5.400E-06
mmu-miR-181a-2*	0.84	1.920E-06
mmu-miR-715	0.84	2.390E-06
hsa-miR-220b	0.84	1.590E-06
mmu-miR-191*	0.84	1.690E-06
mmu-miR-715	0.84	1.680E-06
hsa-miR-19b/mmu-miR-19b/rno-miR-19b	0.84	2.910E-05
hsa-miR-302c/mmu-miR-302c	0.85	3.610E-06
mmu-miR-106a	0.85	7.440E-06
hsa-miR-18b	0.85	1.630E-05
mmu-miR-291a-3p/rno-miR-291a-3p	0.85	1.770E-06
mmu-miR-293	0.85	3.110E-06
hsa-miR-565	0.85	1.530E-06
hsa-miR-340/mmu-miR-340-5p/rno-miR-340-5p	0.85	1.060E-06
hsa-miR-18a/mmu-miR-18a/rno-miR-18a	0.85	3.320E-05
mmu-miR-677	0.85	5.570E-06
hsa-miR-519e	0.86	6.590E-07
hsa-miR-335*/mmu-miR-335-3p	0.86	4.510E-06
hsa-miR-302c/mmu-miR-302c	0.86	9.850E-07
hsa-miR-634	0.86	1.500E-05
hsa-miR-19b/mmu-miR-19b/rno-miR-19b	0.86	8.940E-06
hsa-miR-18b	0.87	1.290E-05
hsa-miR-766	0.87	3.140E-07
hsa-miR-487b/mmu-miR-487b/rno-miR-487b	0.87	3.540E-06
mmu-miR-712*	0.88	2.120E-07
mmu-miR-302c*	0.88	1.740E-07
hsa-miR-616*	0.88	1.550E-07
mmu-miR-677	0.88	1.400E-07
hsa-miR-190/mmu-miR-190/rno-miR-190	0.89	3.800E-07
hsa-miR-578	0.89	8.410E-08
hsa-miR-335*/mmu-miR-335-3p	0.90	1.150E-07
hsa-miR-220b	0.90	4.320E-08
hsa-miR-506	0.91	4.220E-08
mmu-miR-712*	0.91	2.140E-08
rno-miR-421	0.92	1.060E-08
mmu-miR-720	0.92	2.610E-08
hsa-miR-19a/mmu-miR-19a/rno-miR-19a	0.92	1.300E-07
hsa-miR-340/mmu-miR-340-5p/rno-miR-340-5p	0.92	5.580E-09
mmu-miR-720	0.93	1.020E-08
hsa-miR-19a/mmu-miR-19a/rno-miR-19a	0.94	7.250E-08
hsa-miR-19a/mmu-miR-19a/rno-miR-19a	0.94	1.830E-08
hsa-miR-301a/mmu-miR-301a/rno-miR-301a	0.94	1.330E-07
hsa-miR-301a/mmu-miR-301a/rno-miR-301a	0.94	1.640E-08

hsa-miR-19a/mmu-miR-19a/rno-miR-19a	0.94	4.960E-07
hsa-miR-519d	0.95	3.610E-09
hsa-miR-519d	0.95	1.440E-09
hsa-miR-301a/mmu-miR-301a/rno-miR-301a	0.95	6.420E-09
mmu-miR-720	0.95	1.250E-08
hsa-miR-519d	0.96	1.820E-09
hsa-miR-519d	0.96	7.260E-10
hsa-miR-301a/mmu-miR-301a/rno-miR-301a	0.97	1.050E-09
mmu-miR-720	0.97	7.470E-10
hsa-miR-133a/mmu-miR-133a/rno-miR-133a	-1.00	1.550E-15
hsa-miR-133b/mmu-miR-133b/rno-miR-133b	-1.00	1.100E-13
hsa-miR-1/mmu-miR-1	-1.00	9.590E-11
hsa-miR-133b/mmu-miR-133b/rno-miR-133b	-1.00	4.260E-14
miRPlus_17653/mmu-miR-133a*	-1.00	4.880E-14
hsa-miR-1/mmu-miR-1	-1.00	5.110E-10
hsa-miR-133a/mmu-miR-133a/rno-miR-133a	-1.00	8.220E-15
hsa-miR-133a/mmu-miR-133a/rno-miR-133a	-1.00	9.100E-15
hsa-miR-133b/mmu-miR-133b/rno-miR-133b	-1.00	1.490E-13
hsa-miR-1/mmu-miR-1	-0.99	2.610E-10
hsa-miR-1/mmu-miR-1	-0.99	2.790E-10
hsa-miR-133a/mmu-miR-133a/rno-miR-133a	-0.99	7.310E-14
hsa-miR-133b/mmu-miR-133b/rno-miR-133b	-0.99	1.730E-13
miRPlus_17653/mmu-miR-133a*	-0.98	1.200E-12
rno-miR-1	-0.98	6.140E-11
rno-miR-1	-0.98	2.690E-12
hsa-miR-206/mmu-miR-206/rno-miR-206	-0.97	8.460E-10
hsa-miR-203/mmu-miR-203/rno-miR-203	-0.97	7.580E-09
hsa-miR-206/mmu-miR-206/rno-miR-206	-0.96	1.720E-09
hsa-miR-203/mmu-miR-203/rno-miR-203	-0.96	1.080E-08
hsa-miR-10b/mmu-miR-10b/rno-miR-10b	-0.96	3.510E-11
hsa-miR-203/mmu-miR-203/rno-miR-203	-0.96	5.100E-09
hsa-miR-10b/mmu-miR-10b/rno-miR-10b	-0.96	4.650E-11
hsa-miR-10b/mmu-miR-10b/rno-miR-10b	-0.96	7.570E-11
rno-miR-1	-0.96	1.580E-10
rno-miR-1	-0.96	9.310E-11
hsa-miR-378/mmu-miR-378/rno-miR-378	-0.95	3.450E-08
hsa-miR-203/mmu-miR-203/rno-miR-203	-0.95	3.550E-08
hsa-miR-378/mmu-miR-378/rno-miR-378	-0.95	6.890E-08
mmu-miR-203*	-0.94	2.460E-09
hsa-miR-206/mmu-miR-206/rno-miR-206	-0.94	1.140E-09
hsa-miR-378/mmu-miR-378/rno-miR-378	-0.93	1.630E-07
hsa-miR-378/mmu-miR-378/rno-miR-378	-0.93	6.000E-08
hsa-miR-938	-0.92	5.800E-08
hsa-miR-802/mmu-miR-802	-0.92	8.530E-09
hsa-miR-145/mmu-miR-145/rno-miR-145	-0.92	2.670E-07
mmu-miR-203*	-0.91	3.640E-08
hsa-miR-218-2*/mmu-miR-218-2*/rno-miR-218*	-0.91	1.860E-07
hsa-miR-412/rno-miR-412	-0.91	2.300E-08
hsa-miR-412/rno-miR-412	-0.91	1.180E-07

hsa-miR-888	-0.90	4.940E-08
hsa-miR-486-3p	-0.90	3.500E-08
hsa-miR-206/mmu-miR-206/rno-miR-206	-0.90	3.300E-08
hsa-miR-145/mmu-miR-145/rno-miR-145	-0.90	4.750E-07
mmu-miR-763	-0.90	3.530E-07
hsa-miR-145/mmu-miR-145/rno-miR-145	-0.90	8.930E-08
mmu-miR-203*	-0.89	2.140E-07
hsa-miR-938	-0.89	7.440E-08
hsa-miR-218-2*/mmu-miR-218-2*/rno-miR-218*	-0.89	9.630E-08
mmu-miR-203*	-0.89	2.470E-07
hsa-miR-378*/mmu-miR-378*/rno-miR-378*	-0.88	1.330E-07
mmu-miR-763	-0.88	1.510E-06
hsa-miR-193b	-0.88	4.050E-06
hsa-miR-486-3p	-0.88	1.900E-07
hsa-miR-378*/mmu-miR-378*/rno-miR-378*	-0.88	3.710E-07
mmu-miR-763	-0.87	6.170E-07
mmu-miR-568	-0.87	6.630E-07
hsa-miR-378*/mmu-miR-378*/rno-miR-378*	-0.87	3.500E-06
mmu-miR-763	-0.87	4.320E-07
hsa-miR-412/mmu-miR-412/rno-miR-412	-0.87	4.370E-07
mmu-miR-685	-0.87	1.000E-06
hsa-miR-217/mmu-miR-217/rno-miR-217	-0.87	1.530E-06
hsa-miR-205/mmu-miR-205/rno-miR-205	-0.86	2.210E-05
hsa-miR-10a/mmu-miR-10a/rno-miR-10a-5p	-0.86	5.320E-07
hsa-miR-490-3p/mmu-miR-490	-0.86	7.090E-07
hsa-miR-145*/mmu-miR-145*	-0.86	4.880E-07
hsa-miR-10a/mmu-miR-10a/rno-miR-10a-5p	-0.86	9.310E-07
hsa-miR-205/mmu-miR-205/rno-miR-205	-0.86	4.610E-05
mmu-miR-568	-0.86	8.150E-07
hsa-miR-490-3p/mmu-miR-490	-0.86	1.250E-06
hsa-miR-193b	-0.85	1.310E-05
hsa-miR-10b/mmu-miR-10b/rno-miR-10b	-0.85	1.060E-06
hsa-miR-186*	-0.85	1.180E-06
hsa-miR-218-2*/mmu-miR-218-2*/rno-miR-218*	-0.85	1.170E-06
hsa-miR-217/mmu-miR-217/rno-miR-217	-0.85	4.870E-06
hsa-miR-497/mmu-miR-497/rno-miR-497	-0.85	2.750E-05
hsa-miR-654-5p	-0.84	1.590E-06
hsa-miR-579	-0.84	3.130E-06
hsa-miR-432*	-0.84	1.550E-06
hsa-miR-205/mmu-miR-205/rno-miR-205	-0.84	5.080E-05
hsa-miR-193b	-0.84	4.060E-06
hsa-miR-217/mmu-miR-217/rno-miR-217	-0.84	8.720E-06
hsa-miR-490-3p/mmu-miR-490	-0.83	6.230E-06
hsa-miR-802/mmu-miR-802	-0.83	3.690E-06
hsa-miR-193b	-0.83	5.520E-06
hsa-miR-422a	-0.82	4.150E-06
hsa-miR-23a/mmu-miR-23a/rno-miR-23a	-0.82	9.140E-05
hsa-miR-22*/mmu-miR-22*/rno-miR-22*	-0.82	2.250E-05
hsa-miR-205/mmu-miR-205/rno-miR-205	-0.82	6.420E-05

hsa-miR-150/mmu-miR-150/rno-miR-150	-0.82	2.480E-05
hsa-miR-10a/mmu-miR-10a/rno-miR-10a-5p	-0.81	9.620E-06
hsa-miR-412/mmu-miR-412/rno-miR-412	-0.81	6.560E-06
hsa-miR-145/mmu-miR-145/rno-miR-145	-0.81	1.730E-05
hsa-miR-186*	-0.81	9.040E-06
hsa-miR-490-3p/mmu-miR-490	-0.81	1.050E-05
hsa-miR-497/mmu-miR-497/rno-miR-497	-0.81	9.510E-06
hsa-miR-10a/mmu-miR-10a/rno-miR-10a-5p	-0.80	1.870E-05
hsa-miR-27a/mmu-miR-27a/rno-miR-27a	-0.80	1.560E-04
hsa-miR-27a/mmu-miR-27a/rno-miR-27a	-0.80	5.890E-05
hsa-miR-412/mmu-miR-412/rno-miR-412	-0.80	1.120E-05
mmu-miR-761	-0.80	2.070E-05
mmu-miR-704	-0.80	2.130E-05
hsa-miR-648	-0.80	2.870E-05
hsa-miR-107/mmu-miR-107/rno-miR-107	-0.80	4.990E-05
hsa-miR-758/rno-miR-758	-0.80	5.080E-05
hsa-miR-579	-0.80	1.890E-05
rno-miR-344-3p	-0.80	1.380E-05
hsa-let-7b*/mmu-let-7b*/rno-let-7b*	-0.79	6.130E-05
hsa-miR-648	-0.79	2.210E-05
hsa-miR-99a/mmu-miR-99a/rno-miR-99a	-0.79	2.300E-05
hsa-miR-23a/mmu-miR-23a/rno-miR-23a	-0.79	1.570E-04
hsa-miR-432*	-0.79	2.510E-05
mmu-miR-463	-0.79	4.230E-05
hsa-miR-346	-0.79	2.570E-05
rno-miR-489	-0.79	2.100E-05
hsa-miR-422a	-0.79	2.410E-05
hsa-miR-143*	-0.78	2.320E-05
hsa-miR-486-3p	-0.78	2.590E-05
hsa-miR-99a/mmu-miR-99a/rno-miR-99a	-0.78	5.300E-05
hsa-miR-871/mmu-miR-871	-0.78	3.300E-05
hsa-miR-100/mmu-miR-100/rno-miR-100	-0.78	4.850E-05
hsa-miR-186*	-0.78	3.140E-05
mmu-miR-685	-0.77	5.120E-05
hsa-miR-515-5p	-0.77	4.280E-05
hsa-let-7i*/mmu-let-7i*/rno-let-7i*	-0.77	1.380E-04
hsa-miR-422a	-0.77	3.100E-05
hsa-miR-515-5p	-0.77	5.700E-05
mmu-miR-704	-0.77	3.660E-05
hsa-miR-99a/mmu-miR-99a/rno-miR-99a	-0.77	4.770E-05
hsa-miR-497/mmu-miR-497/rno-miR-497	-0.77	3.500E-05
hsa-miR-196a*/mmu-miR-196a*/rno-miR-196a*	-0.77	4.070E-05
hsa-miR-23b/mmu-miR-23b/rno-miR-23b	-0.77	5.250E-04
hsa-miR-330-3p	-0.77	4.500E-05
hsa-miR-24/mmu-miR-24/rno-miR-24	-0.76	7.490E-05
hsa-miR-767-3p	-0.76	4.570E-05
hsa-miR-648	-0.76	4.860E-05
mmu-miR-488*	-0.76	6.560E-05
hsa-miR-488*	-0.76	7.910E-05

hsa-miR-22*/mmu-miR-22*/rno-miR-22*	-0.76	1.620E-04
hsa-miR-548a-5p	-0.76	5.810E-05
hsa-miR-99a/mmu-miR-99a/rno-miR-99a	-0.76	1.660E-04
hsa-miR-145*/mmu-miR-145*	-0.76	5.650E-05
rno-miR-344-3p	-0.76	5.730E-05
hsa-miR-195/mmu-miR-195/rno-miR-195	-0.76	6.480E-05
hsa-miR-509-5p	-0.76	2.330E-04
hsa-miR-515-5p	-0.75	8.440E-05
mmu-miR-687	-0.75	6.440E-05
hsa-miR-938	-0.75	6.470E-05
hsa-miR-100/mmu-miR-100/rno-miR-100	-0.75	8.550E-05
mmu-miR-463	-0.75	2.570E-04
hsa-miR-23b/mmu-miR-23b/rno-miR-23b	-0.75	2.140E-04
hsa-miR-186*	-0.75	7.060E-05
mmu-miR-697	-0.75	2.820E-04
hsa-miR-22*/mmu-miR-22*/rno-miR-22*	-0.75	2.790E-04
hsa-miR-212/mmu-miR-212/rno-miR-212	-0.75	1.560E-04
hsa-miR-551b*	-0.75	1.410E-04
hsa-miR-195/mmu-miR-195/rno-miR-195	-0.75	8.650E-05
hsa-miR-27a/mmu-miR-27a/rno-miR-27a	-0.74	3.900E-04
hsa-miR-135a*/mmu-miR-135a*	-0.74	9.510E-05
hsa-miR-934	-0.74	8.500E-05
mmu-miR-743b-5p	-0.74	1.820E-04
hsa-miR-100/mmu-miR-100/rno-miR-100	-0.74	1.920E-04
hsa-miR-491-3p	-0.74	1.720E-04
hsa-miR-150/mmu-miR-150/rno-miR-150	-0.74	1.430E-04
hsa-miR-768-3p	-0.74	1.810E-04
hsa-miR-127-3p/mmu-miR-127/rno-miR-127	-0.73	8.350E-04
hsa-miR-376c	-0.73	6.390E-04
mmu-miR-540-3p/rno-miR-540	-0.73	2.290E-04
mmu-miR-687	-0.73	5.170E-04
mmu-miR-685	-0.73	1.420E-04
hsa-miR-145*/mmu-miR-145*	-0.73	2.050E-04
hsa-miR-654-5p	-0.73	1.280E-04
hsa-miR-100*	-0.73	4.510E-04
hsa-miR-195/mmu-miR-195/rno-miR-195	-0.73	1.920E-04
hsa-miR-758/rno-miR-758	-0.73	3.410E-04
hsa-miR-195/mmu-miR-195/rno-miR-195	-0.73	2.000E-04
hsa-miR-640	-0.73	1.560E-04
hsa-miR-329	-0.72	1.610E-04

Spontaneous Squamous Cell Carcinoma Induced by the Somatic Inactivation of *Retinoblastoma* and *Trp53* Tumor Suppressors

Ana Belén Martínez-Cruz, Mirentxu Santos, M. Fernanda Lara, Carmen Segrelles, Sergio Ruiz, Marta Moral, Corina Lorz, Ramón García-Escudero, and Jesús M. Paramio

Molecular Oncology Unit, Division of Biomedicine, Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas, Madrid, Spain

Abstract

Squamous cell carcinomas (SCC) represent the most aggressive type of nonmelanoma skin cancer. Although little is known about the causal alterations of SCCs, in organ-transplanted patients the E7 and E6 oncogenes of human papillomavirus, targeting the p53- and pRb-dependent pathways, have been widely involved. Here, we report the functional consequences of the simultaneous elimination of *Trp53* and *retinoblastoma* (*Rb*) genes in epidermis using Cre-loxP system. Loss of p53, but not pRb, produces spontaneous tumor development, indicating that p53 is the predominant tumor suppressor acting in mouse epidermis. Although the simultaneous inactivation of pRb and p53 does not aggravate the phenotype observed in *Rb*-deficient epidermis in terms of proliferation and/or differentiation, spontaneous SCC development is severely accelerated in doubly deficient mice. The tumors are aggressive and undifferentiated and display a hair follicle origin. Detailed analysis indicates that the acceleration is mediated by premature activation of the epidermal growth factor receptor/Akt pathway, resulting in increased proliferation in normal and dysplastic hair follicles and augmented tumor angiogenesis. The molecular characteristics of this model provide valuable tools to understand epidermal tumor formation and may ultimately contribute to the development of therapies for the treatment of aggressive squamous cancer. [Cancer Res 2008;68(3):683–92]

Introduction

The nonmelanoma skin cancer (NMSC), the most common cancer among humans, comprises two major types: squamous cell carcinoma (SCC) and basal cell carcinoma (BCC). Several factors, including the clinical characteristics, differentiate between BCCs and SCCs, being the latter more aggressive with increased metastatic properties. The major factor responsible for development of NMSC is UV radiation (1, 2). However, whereas for BCC development the genetic hallmark is abrogation of the

patched-sonic hedgehog pathway, little is known about the causal alterations of SCCs. Mutations in *Trp53* tumor suppressor gene are frequently observed in both types of tumors. Interestingly, organ transplant recipients have an up to 100-fold increased risk of SCC and a 10-fold increased risk of BCC, resulting in a reversal of the normal ratio of SCC to BCC (2). Several studies have suggested the involvement of cutaneous human papillomaviruses (HPV) in the development of NMSCs, in part through alterations in p53 and pRb pathways mediated by E6 and E7 oncoproteins, respectively (2).

The *Trp53* gene product, p53, coordinates the cellular response to stress, including DNA damage, hypoxia, and oncogenic stress through transcriptional mechanisms, resulting in cell cycle arrest, senescence, or apoptosis (3). The tumor suppressor *retinoblastoma* (*Rb*) also acts through transcriptional mechanisms to regulate cell cycle progression, differentiation, and apoptosis (4). Numerous evidences have shown the functional connection between pRb- and p53-dependent pathways (5, 6). For instance, p21^{waf1} is induced by p53 and negatively regulates cyclin-dependent kinase (cdk) function, leading to the inhibition of mechanisms that functionally inactivate pRb by phosphorylation. In addition, p21^{waf1} can inhibit cell proliferation in cells lacking pRb through direct binding to cdks and E2F transcription factors (7–9). On the other hand, the inactivation of pRb leads to activation of E2F transcription factors, which produces sustained p53 induction through p19^{arf}-dependent (10, 11) and p19^{arf}-independent mechanisms (12, 13). In support of these cooperative functions, different transgenic mouse models bearing inactivation of both tumor suppressor genes have been generated, providing useful prototypes of human tumors of lung (14), medulloblastoma (15), and prostate (16).

In epidermis, the specific ablation of *Rb* gene does not result in spontaneous tumors (17), unless other pRb family members, such as p107, are also inactivated (18).¹ In addition, chemical carcinogenesis protocols in these mice result in reduced number of tumors, which also show smaller size and increased malignant conversion (19). This is mediated, at least in part, by the induction of p53 and the consequent apoptosis at early stages (20). Importantly, the subsequent inactivation of p107 abolishes p53-dependent apoptotic processes, leading to spontaneous tumor formation (18).¹ It has been previously reported that the specific ablation of *Trp53* gene in stratified epithelia leads to spontaneous tumor development (21, 22). However, to our knowledge, there are no studies about the possible cooperation between pRb and p53 in epidermis *in vivo*.

To analyze all these aspects, we sought to create a mouse skin cancer model based on joint inactivation of *Rb* and *Trp53* in

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

A.B. Martínez-Cruz and M. Santos contributed equally to this work.

Current address for S. Ruiz: Centro de Investigación del Cáncer and Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, Consejo Superior de Investigaciones Científicas-University of Salamanca, E-37007 Salamanca, Spain.

Requests for reprints: Jesús M. Paramio, Molecular Oncology Unit, Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas, E-28040 Madrid, Spain. Phone: 34-913460865; Fax: 34-913466484; E-mail: jesusm.paramio@ciemat.es.

©2008 American Association for Cancer Research.
doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-3049

¹ M.F. Lara et al., in press.

stratified epithelia. To this, we bred mice bearing floxed alleles of *Rb* gene (*Rb*^{F19/F19}; ref. 17) with mice bearing floxed alleles of *Trp53* (*Trp53*^{F2/F10}; refs. 22, 23) and with transgenic *K14cre* mice (22). The *Rb*^{F19/F19};*Trp53*^{F2/F10};*K14cre* (thereafter pRb^{-/-};p53^{-/-}) mice, losing these tumor suppressor genes in stratified epithelia (17, 22), and their different allelic combinations, were generated. We show that somatic inactivation of *Trp53* does not produce any evident phenotypic changes nor it aggravates the phenotypic consequences of *Rb* ablation in epidermis. On the other hand, p53 loss leads to spontaneous tumor formation, a process that is dramatically accelerated by simultaneous pRb loss. Such cooperative activities seem to be promoted by the early activation of the epidermal growth factor receptor (EGFR)/Akt axis, leading to an early angiogenic response.

Materials and Methods

Experimental mice and genotyping. Mice of the different genotypes in FVB background [*Rb*^{F19/F19} (17), *Trp53*^{F2/F10} (22, 23), and *K14cre* mice (22)] were genotyped by PCR using specific primers as previously described (17, 22, 23). Mice of all genotypes were monitored for tumor formation over a period of 20 months. Tumor volume was calculated as $\pi(4/3) \times (\text{width}/2)^2 \times (\text{length}/2)$ using isolated tumor specimens. All animals showing obvious tumors or morbidity were sacrificed for necropsy and histopathologic analyses. The animal experiments were approved by the Animal Ethical Committee and conducted in compliance with Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT) Guidelines.

Histologic and immunohistochemical procedures. Samples were fixed in 4% buffered formalin or in 70% ethanol and embedded in paraffin wax. Sections (5 μ m) were stained with H&E or processed for immunohistochemistry. Mice were injected i.p. with bromodeoxyuridine (BrdUrd; 0.1 mg/g weight in 0.9% NaCl; Roche) 1 h before sacrifice. Immunohistochemistry and immunofluorescence were done using standard protocols on deparaffinized sections using antibodies against K5, K6 (1:500; Covance), K10 (k8.60, 1:500; Sigma), K17 (kindly provided by Dr. P. Coulombe, The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD), and K15 (1:50; NeoMarkers). BrdUrd incorporation was monitored by double immunofluorescence in ethanol-fixed samples or in formalin-fixed sections using an anti-BrdUrd antibody (1:50; Roche) as described in the manufacturer's instructions. For detection of active Akt (phosphorylated Akt Ser⁴⁷³; 1:500; Cell Signaling), phosphorylated extracellular signal-regulated kinase (ERK; 1:500; Santa Cruz Biotechnology), cyclin D1 (ready to use; Lab Vision, NeoMarkers), and Foxo3a (1:500; Upstate), the slides were microwaved for 15 min. Immunodetection of CD31 (1:50; PharMingen) and α -smooth muscle actin (α Sma; 1:200; Sigma) in endothelial cells was performed in frozen tumor sections fixed in cold acetone (5 min). Microvessel density, counting, and maturation were analyzed as previously described (24). Biotin-conjugated, FITC-conjugated, and Texas red-conjugated secondary antibodies were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories and used at 1:1,000, 1:50, and 1:500, respectively. Apoptosis was detected with a double immunofluorescence using anti-K5 (to detect epidermal cells) and terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (*In situ* Cell Death Detection kit, Roche) according to the manufacturer's recommendations. Peroxidase was visualized using avidin-biotin complex method and 3,3'-diaminobenzidine kit (Vector). Control slides were obtained by replacing the primary antibodies with PBS (data not shown).

Western blot analysis. Whole skin extracts were ground with a mortar on liquid nitrogen and homogenized in buffer P [Tris (pH 7.5), 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 40 mmol/L β -glycerophosphate, 1 mmol/L sodium orthovanadate, 0.1 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride, 2 mg/mL aprotinin, 2 mg/mL leupeptin, 1% NP40]. Total protein (35 μ g) from at least three pooled samples was used for NuPAGE 4% to 12% Bis-Tris gel (Invitrogen), transferred to nitrocellulose membrane (Invitrogen), and probed with primary antibodies against Akt, ERK2, phosphorylated ERK1/2, EGFR, phosphorylated tyrosine, Sprouty 2, Errf1 (Santa Cruz

Biotechnology), and phosphorylated Akt (Cell Signaling). Actin (Santa Cruz Biotechnology) was used to normalize the loading. Secondary antibodies anti-rabbit, anti-mouse, or anti-goat IgG were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories. Chemiluminescence was performed using the manufacturer's recommendations (Pierce).

RNA purification and Affymetrix mouse GeneChip 430A analysis. Newborn mouse skin tissue was preserved in RNAlater (Ambion) and disrupted and homogenized using Mixer Mill MM301 (Retsch). Total RNA was extracted and purified from 30 mg of skin using RNeasy Fibrous Tissue Mini kit (Qiagen) following the manufacturers' recommendations. The integrity of the RNA populations was tested in the Bioanalyzer (Agilent) showing at least 1.4 28S to 18S ratio. Hybridization of pooled samples from three animals of each genotype into Affymetrix MOE 430A microarrays was performed per duplicate at the Genomic Facility of the Cancer Research Center (Salamanca, Spain). We exported CEL files from Affymetrix GeneChip Operating Software and performed background subtraction with robust multichip average (25) and normalized the chips with the quantile method (26) using the Gene Expression Pattern Analysis Suite (27). The signal intensity values of each probe set were log₂ transformed. Further analyses were performed using the MeV software (28). The selection of genes differentially expressed between control and mutant mice (1,435 gene IDs) was made using ANOVA analysis ($P \leq 0.01$). The list of significant genes implicated in phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and angiogenesis process was searched using Gene Ontology Biological Process.

Results

Phenotypic consequences of *Rb* and *Trp53* ablation in epidermis. The epidermis from mice lacking *Trp53* (*Rb*^{wt/wt};*Trp53*^{F2/F10};*K14cre*, thereafter pRb^{+/+};p53^{-/-}) was normal and indistinguishable from wild-type mice (Fig. 1A). In contrast, *Rb* depletion in epidermis (*Rb*^{F19/F19};*Trp53*^{wt/wt};*K14cre*, thereafter pRb^{-/-};p53^{+/+}) leads to moderate hyperplasia, which is not further increased by *Trp53* loss in double-deficient mice (*Rb*^{F19/F19};*Trp53*^{F2/F10};*K14cre*, thereafter pRb^{-/-};p53^{-/-}; Fig. 1A). Differentiation analysis (Fig. 1B) revealed no abnormalities in the expression of various keratins (K5, K6, K10, K17, and K15) or other differentiation proteins (filaggrin, loricrin, and involucrin) in mice bearing the epidermal-specific ablation of *Trp53* compared with control mice (Fig. 1B; data not shown). As reported (17), pRb-deficient epidermis displayed expansion of K5 into suprabasal layers, coexpression of K5 and K10, and induction of K6 in some areas of the interfollicular epidermis. Again, these alterations are not further aggravated by subsequent loss of *Trp53* (Fig. 1B; data not shown).

Epidermal proliferation, analyzed by BrdUrd incorporation, showed no significant increase in the *Trp53*-deficient epidermis compared with wild-type epidermis (Supplementary Fig. S1; see also Fig. 4A). In agreement with our previous data (17), we found increased proliferation in pRb-deficient epidermis, which was nonaugmented by the simultaneous absence of both tumor suppressors in the interfollicular epidermis. Interestingly, we observed increased proliferation in hair follicles of pRb^{-/-};p53^{-/-} mice (see below). Finally, we also observed a significant BrdUrd incorporation in some scattered dermal cells in the dermis (denoted by arrows in Supplementary Fig. S1) in pRb^{+/+};p53^{-/-} and pRb^{-/-};p53^{-/-} samples.

Collectively, these observations show that the epidermal-specific ablation of p53 does not produce any obvious phenotypic abnormalities nor aggravate those produced by pRb ablation with respect to proliferation and differentiation, being the only alteration detected the abnormal proliferation of scattered cells in the dermis.

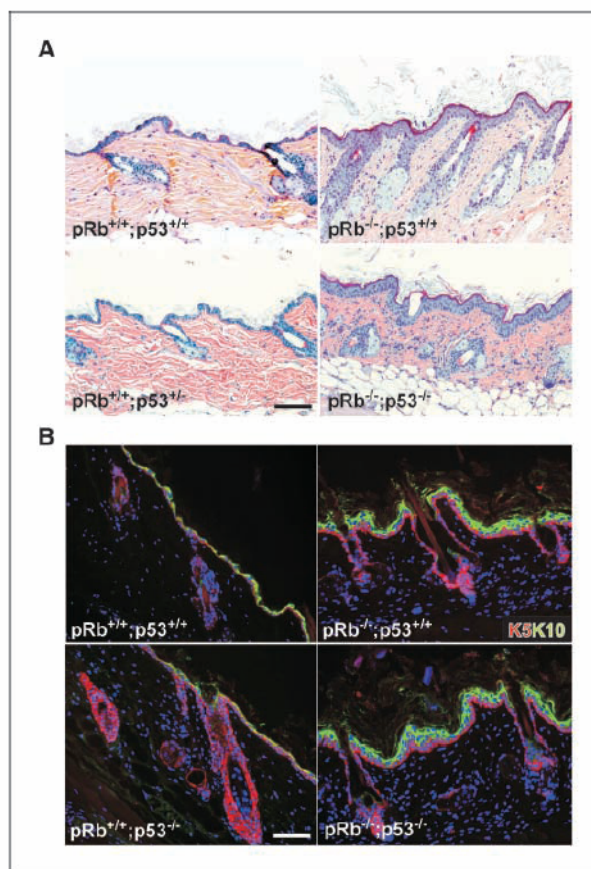


Figure 1. Phenotypic consequences of *Rb* and *Trp53* ablation in epidermis. **A**, H&E-stained skin sections of $pRb^{+/+};p53^{+/+}$ ($Rb^{wt/wt};Trp53^{wt/wt};K14cre$), $pRb^{-/-};p53^{+/+}$ ($Rb^{F19/F19};Trp53^{wt/wt};K14cre$), $pRb^{+/+};p53^{-/-}$ ($Rb^{wt/wt};Trp53^{F2/F10};K14cre$), and $pRb^{-/-};p53^{-/-}$ ($Rb^{F19/F19};Trp53^{F2/F10};K14cre$) adult mice showing a moderate hyperplasia with *pRb* loss, which is not aggravated by the simultaneous loss of *pRb* and *p53*. **B**, immunofluorescence analysis showing the expression of the keratin K5 (red) and differentiation keratin K10 (green) in the epidermis of the control and the quoted mutant mice. *pRb* absence induces an expansion of K5 into suprabasal layers and a coexpression of K5 and K10. These alterations are not aggravated by *p53* loss. Bar, 100 μ m.

Spontaneous tumors in mice bearing the *Rb* and *Trp53* ablation in epidermis. Despite the fact that *p53* loss in epidermis did not cause any evident phenotype in nonlesional skin, we observed that all the mice lacking *p53* in epidermis developed spontaneous tumors (Fig. 2A). The onset of appearance of these lesions is 5 months of age and all the mice developed tumors by 12 months of age (median, 8.3 ± 1.1 months). The tumor susceptibility is accelerated in double-deficient mice (Fig. 2A), where we observed that the onset of tumor appearance was 3 months and all mice developed tumors by 8 months (median, 5.5 ± 1.4 months; $P \leq 0.0009$). The multiplicity of tumors is also increased in double-deficient mice compared with *Trp53*-deficient mice (3.4 ± 0.7 versus 1.1 ± 0.8 , respectively; $P \leq 0.0006$). Of note, the type and localization of the tumors were similar between $pRb^{+/+};p53^{-/-}$ and $pRb^{-/-};p53^{-/-}$ mice and almost exclusively affected different areas of the skin, such as neck, snout, perianal, face, and back skin, which in most cases do not produce external wounds. Histology analysis revealed that all these tumors

were predominantly epidermal SCCs (84.5% of 197 tumors analyzed). These results showed that *p53* is an essential tumor suppressor in epidermis, in agreement with others (21, 22, 29). In addition, our data also indicate that *pRb* and *p53* cooperate to suppress mouse skin tumorigenesis.

To further analyze the cooperation between both tumor suppressors, we performed a detailed study of tumor development in a large cohort of mice bearing different combinations of *Trp53* and *Rb* alleles. In these analyses, we found that *Rb* heterozygosity did not increase the rate of appearance of tumors in mice lacking *Trp53* (Fig. 2B). On the other hand, *Trp53* heterozygosity in $pRb^{-/-}$ mice leads to spontaneous tumor development, although it is significantly delayed compared with complete *Trp53* loss (Fig. 2C). We also detected loss of the remaining *Trp53* allele in some tumors of $pRb^{-/-};p53^{+/+}$ and $pRb^{-/-};p53^{+/-}$ mice (data not shown). The rate of appearance of tumors was similar between $pRb^{-/-};p53^{+/+}$ and $pRb^{-/-};p53^{+/-}$ (Fig. 2C). Consequently, the tumor susceptibility attributable to *Trp53* loss, either complete or in heterozygosity, is only accelerated by the complete loss of *Rb*.

Hair follicle origin of spontaneous tumors. The vast majority of the tumors observed in all the genotypes correspond to poorly differentiated SCCs with loss or reduced expression of suprabasal keratins K10, K6, and K17 (Fig. 3A). Interestingly, the study of skin of tumor-bearing mice revealed multiple dysplastic hair follicles, which in most cases are also characterized by the presence of tumoral cell masses arising from the tip of these structures (Fig. 3B). This suggests that the tumors might have a hair follicle origin. This observation was further supported by the finding that early-stage tumors, associated with dysplastic hair follicles, express markers such as keratins K15 and K17 in addition to the basal keratin K5 (Fig. 3B) and suprabasal K6 (data not shown). Importantly, the incidence of these type of lesions is higher in $pRb^{-/-};p53^{-/-}$ (41.6%; $n = 36$) compared with $pRb^{+/+};p53^{-/-}$ (23.5%; $n = 17$) mice.

The augmented proliferation observed in $pRb^{-/-};p53^{-/-}$, compared with $pRb^{+/+};p53^{-/-}$ mouse epidermis and hair follicles (Supplementary Fig. S1), would suggest that this process could be involved in the increased tumor susceptibility observed in $pRb^{-/-};p53^{-/-}$ mice. We have thus monitored BrdUrd incorporation in nonlesional interfollicular epidermis, nonlesional and dysplastic hair follicles, and tumors at early and advanced stage (Fig. 4A; Supplementary Figs. S1 and S2). We observed a significant increase in proliferation in $pRb^{-/-};p53^{-/-}$ nonlesional hair follicles, which was similar to that displayed by dysplastic hair follicles and early-stage and advanced tumors (Fig. 4A). Notably, the $pRb^{+/+};p53^{-/-}$ nonlesional hair follicles did not show such increased proliferation (Fig. 4A; see also Supplementary Fig. S1). A moderate increase in BrdUrd incorporation was only observed in *p53*-deficient early lesions (Fig. 4A; see also Supplementary Figs. S1 and S2) but below the proliferation rate of advanced tumors (Fig. 4A). However, we did not detect significant changes in proliferation between $pRb^{+/+};p53^{-/-}$ and $pRb^{-/-};p53^{-/-}$ tumors at advanced stage (Fig. 4A) probably because the $pRb^{+/+};p53^{-/-}$ tumors have selected for loss of *Rb* function.

We next studied possible differences in apoptosis. In agreement with the key roles of *p53* modulating this process, the apoptotic rate was extremely low in all the cases. Moreover, we did not detect significant differences in the apoptotic rate between $pRb^{+/+};p53^{-/-}$ and $pRb^{-/-};p53^{-/-}$ mice in normal or dysplastic hair follicles nor in tumors either at early or advanced stage (data not shown; Supplementary Fig. S3).

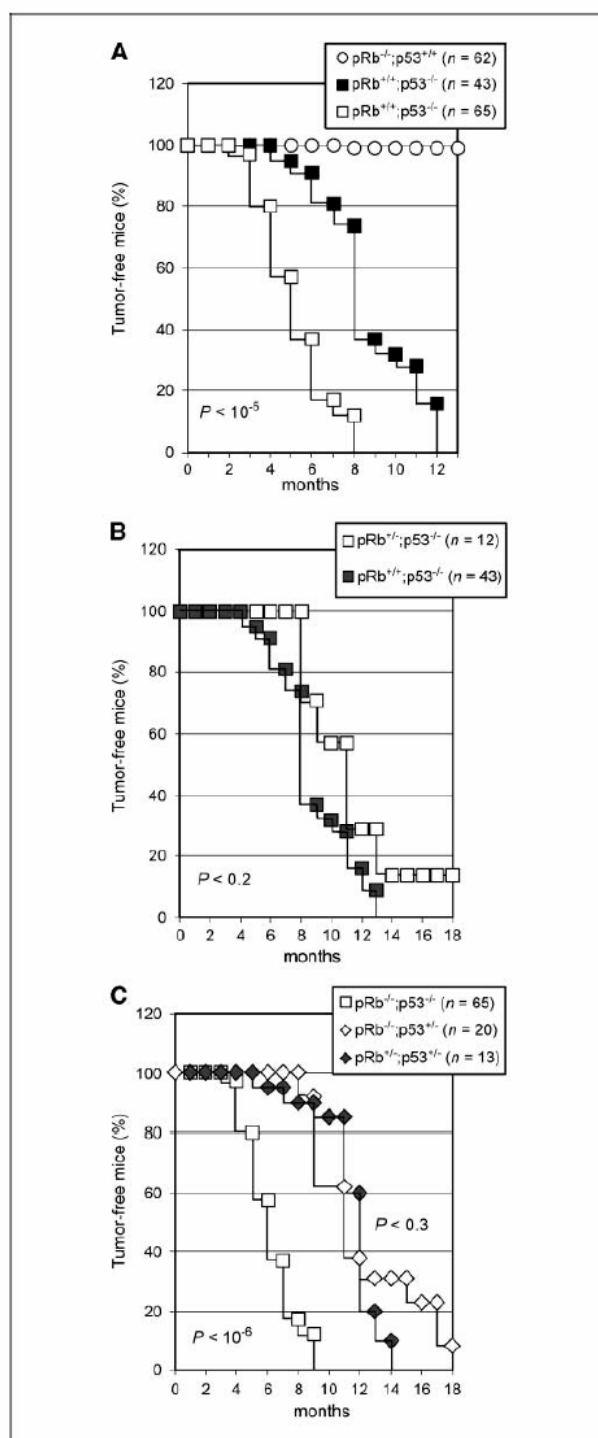


Figure 2. Spontaneous tumorigenesis in mice bearing the *Rb* and *Trp53* ablation in epidermis. Kaplan-Meier distribution of tumor-free mice as a function of age (months) comparing pRb^{-/-};p53^{-/-} (*Rb*^{F19/F19}; *Trp53*^{F2/F10}; K14cre; n = 65), pRb^{+/+};p53^{-/-} (*Rb*^{wt/wt}; *Trp53*^{F2/F10}; K14cre; n = 43), and pRb^{-/-};p53^{+/+} (*Rb*^{F19/F19}; *Trp53*^{wt/wt}; K14cre; n = 62; A); pRb^{+/+};p53^{-/-} (n = 12) and pRb^{+/+};p53^{+/+} (n = 43; B); and pRb^{-/-};p53^{+/+} (n = 65), pRb^{+/+};p53^{+/+} (n = 13), and pRb^{-/-};p53^{-/-} (n = 20; C). n, number of mice of each genotype analyzed. The values of P for paired samples are provided.

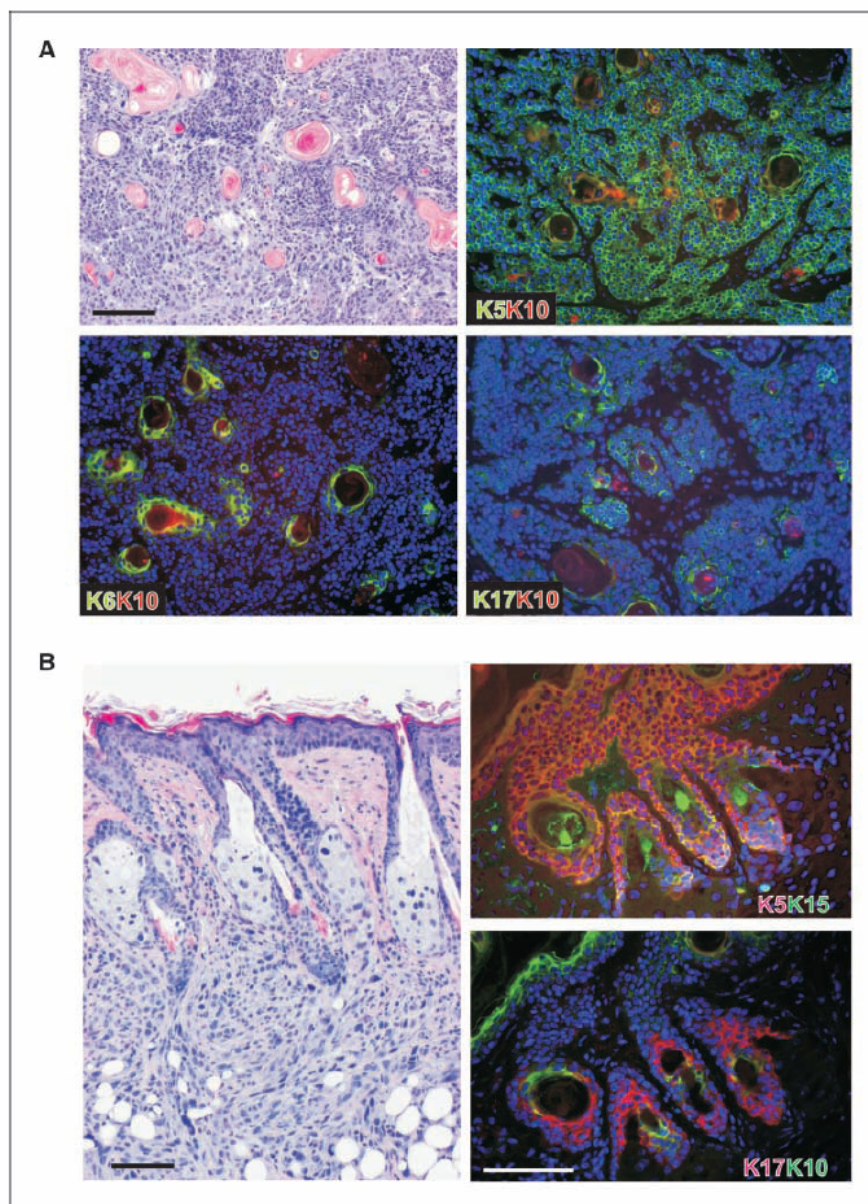
Collectively, these data indicate that the increased incidence and early appearance of tumors in pRb^{-/-};p53^{-/-} mice is attributable to increased proliferation but not to altered apoptosis in hair follicles, leading to early dysplasia and malignant conversion.

We also monitored the growth rate of the tumors. However, as the dysplastic and early-stage tumors were only detectable during histology analyses, we focused only in advanced isolated tumors. We observed increased volume in double-deficient mice tumors compared with p53-deficient tumors in age-matched samples (Fig. 4B). This result indicates that, in spite of similar proliferation rates, double-deficient tumors might have alternative mechanisms leading to augmented tumor growth.

Finally, as the SCC can undergo epithelial mesenchymal transition (EMT) leading to the formation of highly aggressive spindle cell carcinomas, we analyzed whether EMT is increased in the absence of pRb and p53. A significant number of spindle cell carcinomas was observed in pRb^{+/+};p53^{-/-} and pRb^{-/-};p53^{-/-} mice (Supplementary Fig. S4). We found that the rate of appearance of spindle cell carcinomas is slightly accelerated in pRb^{-/-};p53^{-/-} compared with pRb^{+/+};p53^{-/-} (Supplementary Fig. S4). However, the rate of conversion of SCC into spindle cell carcinoma was similar between the two genotypes (Supplementary Fig. S4), suggesting that EMT is not significantly altered in double-deficient tumors.

Molecular mechanisms of cooperative functions between pRb and p53. The cooperation between pRb and p53 has not been previously described in epidermal tumorigenesis. To characterize the molecular basis that may justify the accelerated tumor development in doubly deficient mice, we focused on the possible involvement of specific signal transduction pathways. The Akt and mitogen-activated protein kinase (MAPK)/ERK signaling pathways have been shown as key processes in mouse skin tumorigenesis (30, 31). Therefore, we analyzed the activation of these pathways in the spontaneous tumors (Fig. 5A). Compared with pRb^{+/+};p53^{-/-}, pRb^{-/-};p53^{-/-} tumors displayed increased phosphorylation of Akt (Fig. 5A). Similarly, pRb^{-/-};p53^{-/-} tumors displayed increased ERK1/2 phosphorylation compared with tumors arising in pRb^{+/+};p53^{-/-} mice (Fig. 5A). However, in this case, phosphorylated ERK was mainly localized in the tumor stroma rather than in tumoral cells. In agreement with the increased Akt activation, we observed that pRb^{-/-};p53^{-/-} tumors displayed increased nuclear localization of cyclin D1, whereas Foxo3a showed almost exclusively cytoplasmic localization compared with tumors from pRb^{+/+};p53^{-/-} mice (Fig. 5A). Because the increase in Akt activity would justify the increase in proliferation observed in pRb^{-/-};p53^{-/-} hair follicles, which precedes tumor development, we analyzed whether the activation of Akt takes place in nonlesional epidermis. Western blot showed increased phosphorylated Akt and decreased phosphorylated ERK2 in pRb^{-/-};p53^{-/-} nonlesional skin (Fig. 5B). Moreover, microarray analyses showed that multiple genes involved in EGFR/Akt/ERK pathway were deregulated in pRb^{-/-};p53^{-/-} newborn skin (Fig. 5C). In particular, we found decreased expression of *Errfi1*, which acts as a negative regulator of EGFR signaling, whereas some ligands, such as *Btc*, are up-regulated. We confirmed by Western blot the increased tyrosine phosphorylation and thus activation of EGFR in skin of double-deficient mice without increased EGFR expression and in parallel with decreased *Errfi1* expression (Fig. 5B). These data may justify the increased Akt activity observed in nonlesional skin. This activation is also supported by the increased expression of *Igf2*, *Pdgfra*, and *Pdpk1* genes (Fig. 5C). In addition, we also observed increased expression

Figure 3. Hair follicle origin of spontaneous tumors. **A**, histology and immunofluorescence analysis of poorly differentiated SCCs from a $pRb^{-/-};p53^{-/-}$ ($Rb^{F19/F19};Trp53^{F2/F10};K14cre$) mouse showing the sustained expression of K5 and reduced expression of K10, K6, and K17 (colors in tabs denote the specific keratin). **B**, H&E-stained section showing a representative example of s.c. tumor mass arising from the hair follicle in a $pRb^{-/-};p53^{-/-}$ ($Rb^{F19/F19};Trp53^{F2/F10};K14cre$) mouse. The expression of K5 (red) and K15 (green) and K17 (red) and K10 (green) supports the possible follicular origin of these lesions. Bar, 100 μ m.



of *Spry2* (Fig. 5C), whose gene product, Sprouty 2, inhibits the activation of MAPK pathway induced by activated EGFR (32). We observed increased expression of Sprouty 2 in the skin of mice lacking p53, which was more evident in $pRb^{-/-};p53^{-/-}$ skin (Fig. 5B). This finding may help to explain why the activation of EGFR leads to increased Akt, but not ERK activity, in the pretumoral stages of $pRb^{-/-};p53^{-/-}$ skin.

The absence of *Rb* and *Trp53* induces a premature increased angiogenic response. The increased Akt activity found in tumors and pretumoral skin would be responsible for the increased susceptibility to spontaneous tumor development. Akt signaling is involved in increased proliferation and decreased apoptosis (33–35). Moreover, we have recently observed that the expression of a constitutively active Akt in mouse epidermis leads to spontane-

ous tumor formation and heightened susceptibility to chemical carcinogenesis mainly through the increase in proliferative signals (36). This may be responsible for the accelerated appearance of tumors in $pRb^{-/-};p53^{-/-}$ skin. However, we did not observe alterations in proliferation or apoptosis in advanced tumors lacking *Rb* and *Trp53* compared with those observed in mice lacking *Trp53* (Fig. 4A; Supplementary Figs. S2 and S3), whereas a significant increase in growth was observed in $pRb^{-/-};p53^{-/-}$ tumors (Fig. 4B), indicating that other processes can be involved. There is broad evidence on the involvement of PTEN/Akt signaling in tumor angiogenesis (37, 38), and we have observed that Akt may specifically mediate an angiogenic switch in keratinocytes through transcriptional and posttranscriptional mechanisms (24, 39). In support of this, the appearance of $pRb^{-/-};p53^{-/-}$ tumors suggests

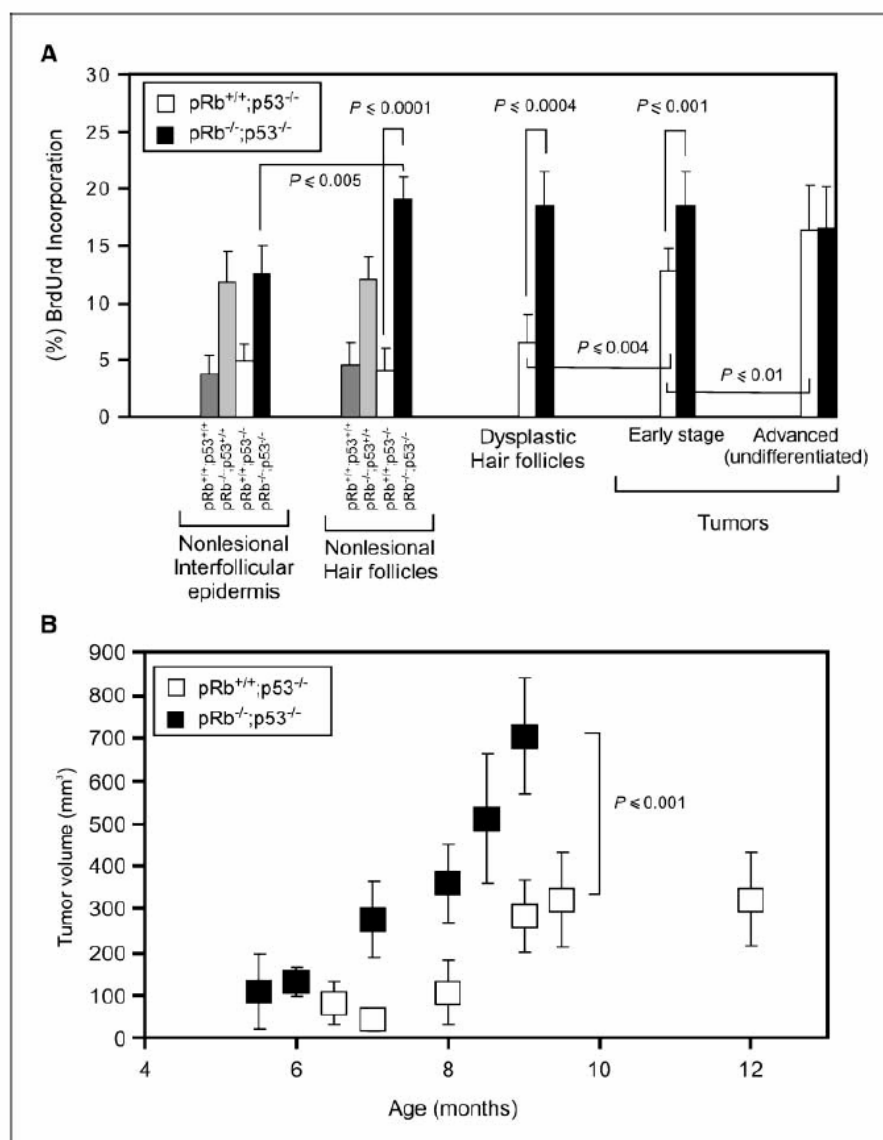


Figure 4. Proliferation and growth in spontaneous tumors. **A**, percentage of BrdUrd incorporation in interfollicular epidermis, nonlesional and dysplastic hair follicles, and tumors at early or advanced stage. Data come from the analysis of at least 10 different samples. Columns, mean; bars, SE. **B**, median volume (\pm SE) of the tumors isolated from pRb^{-/-};p53^{-/-} (Rb^{F19F19};Trp53^{F2F10};K14cre) and pRb^{+/+};p53^{-/-} (Rb^{wt/wt};Trp53^{F2F10};K14cre) at different ages (months). The values of *P* obtained after *t* test of paired samples are provided.

increased vascularity (data not shown). Consequently, we monitored the possible changes in angiogenesis in tumors.

We analyzed the tumor-associated vascularization in frozen sections of the tumors, which were stained for the endothelial junction molecule CD31 (40). In pRb^{+/+};p53^{-/-} and pRb^{-/-};p53^{-/-} tumor samples (Fig. 6A), the vessels seemed similar to those observed in poorly differentiated carcinomas (40). However, an increased number of vessels were observed in doubly deficient tumors. To verify this observation in a quantitative manner, computer-assisted morphometric image analysis was performed in the CD31-stained sections. This revealed that both vessel density and the relative area occupied by tumor blood vessels were increased in pRb^{-/-};p53^{-/-} tumors compared with pRb^{+/+};p53^{-/-} samples (Fig. 6B). In support of this augmented angiogenic switch, we also detected that the number of mature vessels, coexpressing CD31 and the pericyte marker α Sma (Fig. 6A), was reduced in double-deficient tumors compared with pRb^{+/+};p53^{-/-} samples

(Fig. 6B). Finally, the altered angiogenesis was further supported by microarray analysis, which also showed increased expression of multiple angiogenic factors, such as *Pdgfa*, *Pitx2*, and *Ptgs2* (cyclooxygenase 2), and decreased expression of antiangiogenic molecules, such as *Foxo1*, *Col18a1* (endostatin), and *Timp3*, in double-deficient newborn skin (Fig. 6C).

Collectively, these results indicate that the increased growth of pRb^{-/-};p53^{-/-} tumors is also supported by increased angiogenesis.

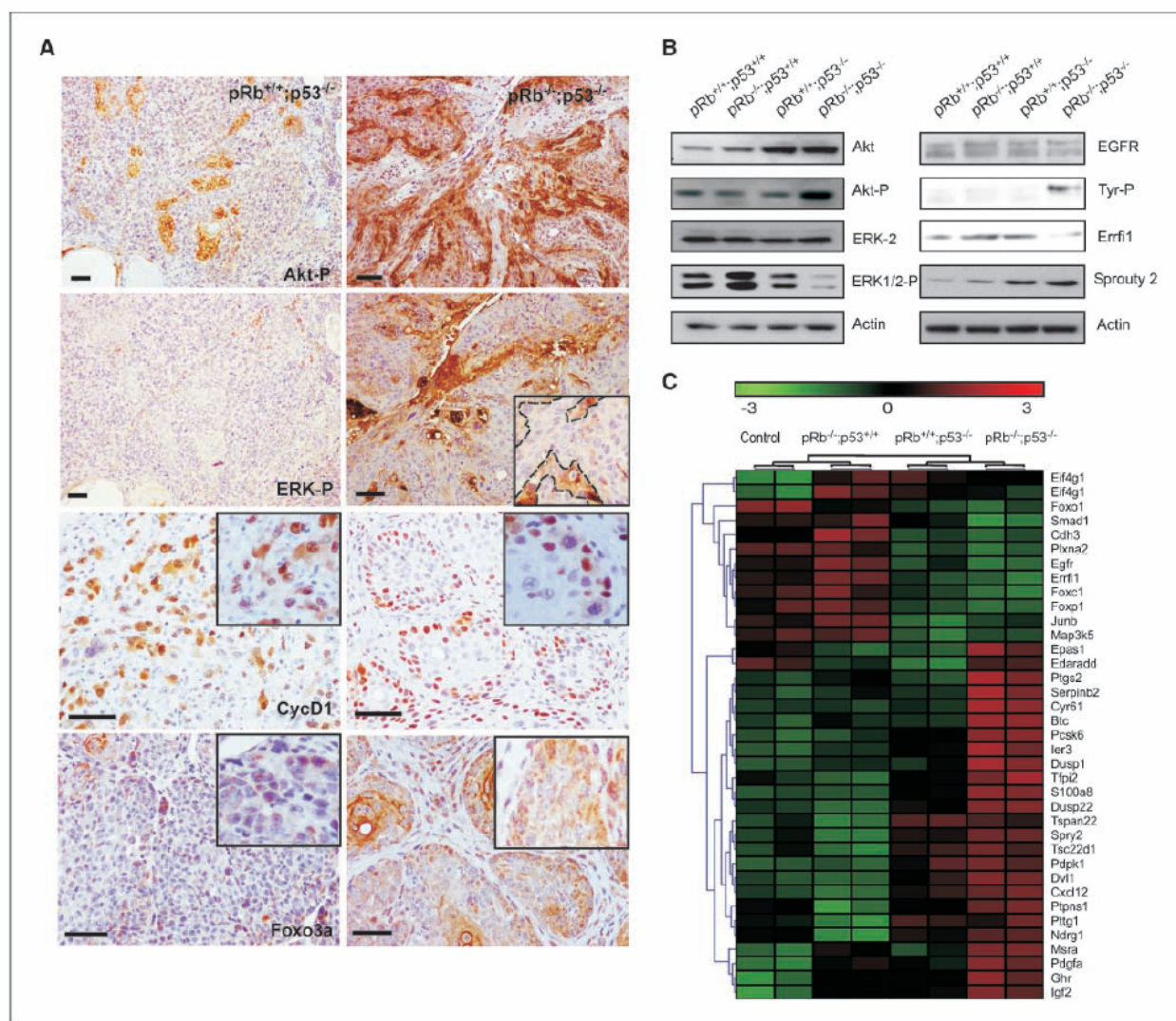
Discussion

SCCs are, together with BCC, the prevalent tumor types of NMSC (2). SCCs are characterized by increased aggressiveness and metastatic properties, but the molecular basis of their development is still poorly understood. This is a relevant issue as the immunosuppressed population of organ-transplanted patients displays severely increased susceptibility to SCC occurrence (2), mediated

in part by cutaneous HPV infection. The relevance of SCC in human tumorigenesis is also highlighted because it is the most frequent type of tumor in head and neck and cervix and also occurs as a minor metaplastic type in breast and lung. All these aspects reinforce the necessity of developing more accurate models of SCC that can be used as preclinical tools.

The tumorigenic properties of HPV have been associated with the expression of E6 and E7 oncoproteins, which target the p53 and the pRb-dependent pathways, respectively (2). This has led us to hypothesize that the ablation of *p53* and *pRb* genes would recapitulate SCCs. Previous work has shown that the specific ablation of *p53* gene in stratified epithelia confers high susceptibility to skin SCC development (21, 22, 29). Our present

data agree with these observations. On the contrary, the epidermal-specific ablation of *Rb* gene does not confer susceptibility to spontaneous skin tumor development (17), and on chemical carcinogenesis experiments, the absence of pRb in epidermis produced increased resistance to tumorigenesis but also higher malignant rate of conversion (19). These aspects have been previously associated to the induction of p53, which causes a selective pressure leading to the premature loss of p53 functions (19, 20). In support of these findings, we have also observed that the simultaneous absence of pRb and p107 leads to spontaneous tumor formation in part through the abrogation of p53-dependent apoptotic processes (18).¹ These data suggest that the simultaneous absence of p53 and pRb would cooperate in the skin tumor



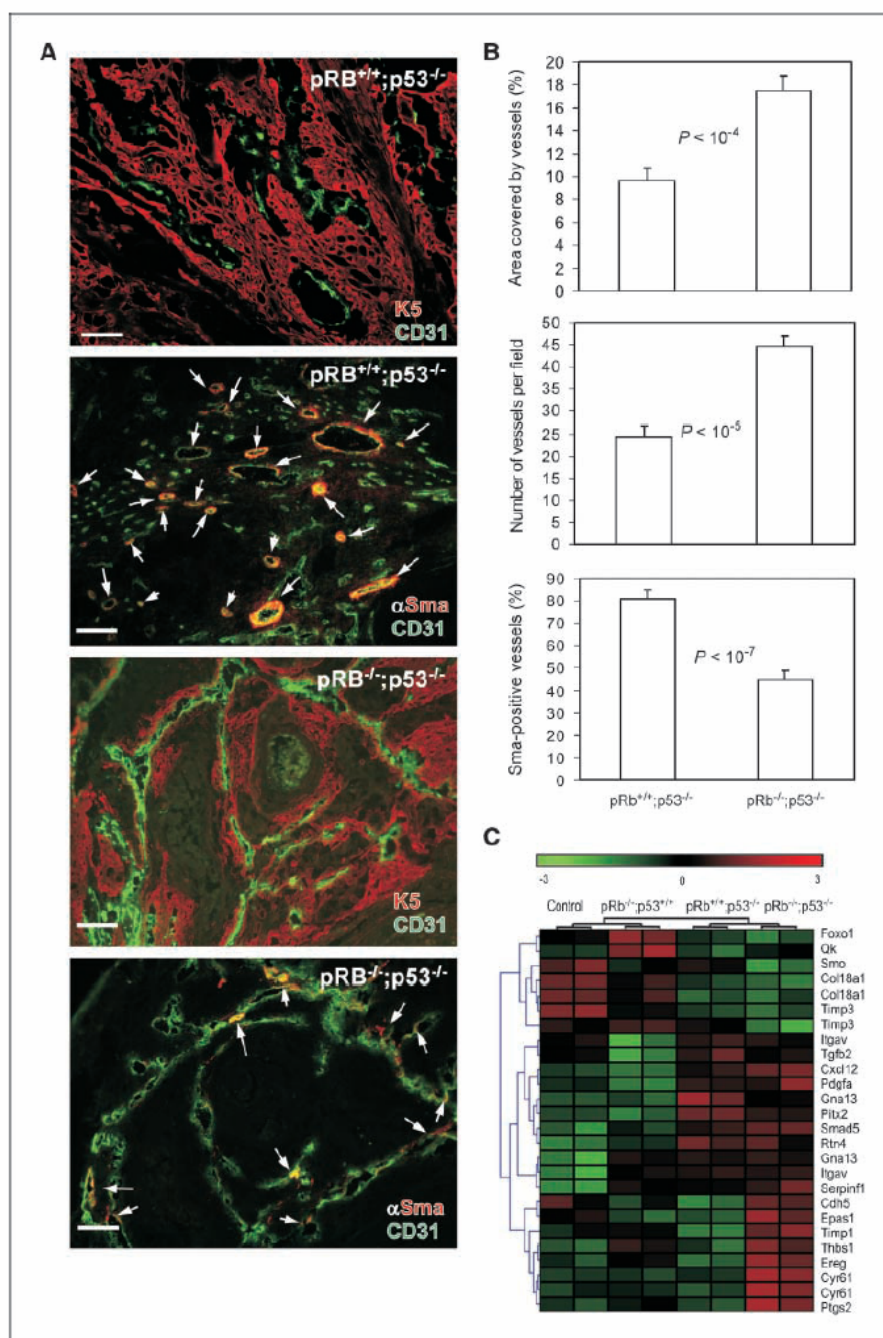


Figure 6. Angiogenic response in $pRb^{+/+};p53^{-/-}$ and $pRb^{-/-};p53^{-/-}$ spontaneous tumors. **A**, examples of the immunofluorescence analysis of epithelial keratin K5, endothelial junction molecule CD31, and pericyte marker α Sma in $pRb^{+/+};p53^{-/-}$ ($Rb^{w/w};Trp53^{F2/F10};K14cre$) and $pRb^{-/-};p53^{-/-}$ ($Rb^{F19/F19};Trp53^{F2/F10};K14cre$) spontaneous tumors. **B**, quantitative analysis of the percentage of area covered by blood vessels, number of blood vessels per field, and percentage of α Sma-positive vessels in spontaneous tumors showing the increased vascularization in $pRb^{-/-};p53^{-/-}$ ($Rb^{w/w};Trp53^{F2/F10};K14cre$) compared with $pRb^{+/+};p53^{-/-}$ ($Rb^{F19/F19};Trp53^{F2/F10};K14cre$). Data come from five to nine different tumors of each genotype. **C**, heat map graphical representation showing the relative expression of genes involved in angiogenic processes obtained after microarray analysis of newborn skin of mice of the quoted genotypes.

formation as previously reported for prostate, lung, and cerebellum tumors (14–16).

The present data, besides confirming the relevance of p53 as a tumor suppressor in epidermis (41), also show that the simultaneous absence of pRb and p53 accelerates the rate of tumor appearance. The importance of p53 in suppressing mouse tumor development has been previously shown in multiple tissues, including epidermis (42, 43). In this last case, it has been shown that depletion of p53 gene, or generation of epidermal-specific

knock in, produces spontaneous tumors and increases the susceptibility to carcinogenic treatments (21, 22, 29). Therefore, we have studied in depth the mechanisms that might confer the increased susceptibility in the absence of Rb and Trp53.

We found that the loss of p53 in epidermis has no significant consequences in terms of proliferation and/or differentiation nor it aggravates these alterations caused by specific Rb loss. Nonetheless, we observed augmented proliferation in $pRb^{-/-};p53^{-/-}$ pretumoral hair follicles, which might be responsible for

the observed increased tumor development. Indeed, the tumors were initially detected as s.c. masses, and histology revealed pretumoral alterations in hair follicle structures. It is worth mentioning that the putative epidermal stem cells are located in these structures (44), which could indicate that the absence of these tumor suppressors might have a functional effect on this cell population. A similar observation has been recently shown in the prostate in close relationship with carcinogenesis (45). In support of this suggestion, we found an increased number of cells expressing K15, a putative marker of epidermal stem cells (46) in the early lesions. However, we did not find K15-positive cells in advanced tumors. This may indicate that the K15-positive cells either are lost or change their phenotypic characteristics during tumor progression.

On the other hand, we did not find significant apoptosis in skin or differences in apoptotic rates between pRb^{+/+};p53^{-/-} and pRb^{-/-};p53^{-/-} tumors. This is in contrast with the increased apoptosis observed in the tumors generated by chemical carcinogenesis in pRb-deficient mice (19) and reinforces the previous suggestion that, on oncogenic stress, the absence of pRb can cause apoptosis in a p53-dependent manner (20).¹

The Akt and MAPK signaling pathways have been previously involved in the genesis of SCC in mouse skin (30, 36, 39). We thus investigated whether these pathways act differentially in pRb^{+/+};p53^{-/-} and pRb^{-/-};p53^{-/-} tumors. The data clearly showed an increased Akt activity leading to increased nuclear cyclin D1 and cytoplasmic Foxo3a localization in pRb^{-/-};p53^{-/-} tumors. These data are in close parallelism with the findings obtained in human head and neck SCC and Akt-transformed mouse keratinocytes (39, 47). On the other hand, the apparent increase in MAPK was significantly confined to the stromal component of the pRb^{-/-};p53^{-/-} tumors. This would imply that this signaling pathway is not responsible for the increased tumorigenicity, at least in a cell autonomous process, and suggests that several changes occur in the stroma of these tumors. Whether these changes may affect the tumor development remains unknown at present. The absence of active ERK1/2 in nonlesional mouse skin extracts, in contrast with the increased Akt activity, supports the hypothesis that MAPK signaling contributes to the maintenance but not to the generation of the tumors. Notably, such increase in Akt activity seems to be mediated by increased EGFR signaling. This pathway has a dramatic relevance in SCC in human and mice. Our data indicate that, in p53^{-/-};pRb^{-/-} skin, this increased signaling does not proceed through increased EGFR expression but rather down-regulation of negative regulators of this pathway, such as *Erff1*. In this regard, it has been shown that the *Erff1*^{-/-} mice develop spontaneous tumors in various organs and are highly susceptible to chemically induced formation of skin tumors (48).

EGFR activation can trigger both MAPK/ERK and Akt activity; however, in the absence of *Egfr* amplification, activating mutations of EGFR selectively activate Akt but have no effect on ERK signaling (49). Our data completely fit into this aspect. In addition, the ectopic Sprouty 2 expression observed in doubly deficient skin can contribute to this finding. This putative tumor suppressor can be induced by EGFR/MAPK signaling and produces the feedback inhibition of MAPK/ERK (50).

Akt activities in oncogenesis are diverse and have been mainly associated with the inhibition of apoptosis and increased proliferation (35, 37). However, as mentioned above, we did not detect decreased apoptosis or increased proliferation in pRb^{-/-};p53^{-/-} compared with pRb^{-/-};p53^{+/+} tumors at advanced stage. Moreover, in spite of these similar proliferation rates, there is increased tumor growth in pRb^{-/-};p53^{-/-} mice, suggesting an alternative mechanism. In this regard, the PTEN/Akt pathway has also been involved in tumorigenesis through nonautonomous cell mechanisms that include angiogenic switch (37). In support of this, we found increased number of blood vessels, which also display immaturity features, in pRb^{-/-};p53^{-/-} compared with pRb^{+/+};p53^{-/-} tumors and altered expression of genes involved in angiogenesis. These observations agree with the reported increased angiogenesis in HPV16 E6- and E7-transduced human primary keratinocytes (51) and our previous data showing that increased Akt activity may mediate an increase in skin tumorigenesis through increased angiogenesis (24).

Collectively, we report the generation of a mouse model of SCC through the epidermal ablation of *Rb* and *Trp53* genes. We have also carried out a detailed molecular characterization of the signaling pathways responsible for the increased susceptibility of epidermal tumor development in this model. Functional comparative studies for the validation of the model as a preclinical tool are currently being performed. These will clearly open new possibilities of pharmacologic intervention for the treatment of these tumors.

Acknowledgments

Received 8/10/2007; revised 10/8/2007; accepted 11/12/2007.

Grant support: Oncocycle (CAM), ISCIII-RETIC RD06/0020 (MSC), SAF2005-00033 (MCYT), and Oncology Program from La Caixa Foundation (J.M. Paramio). M. Moral is a recipient of a FIS-BEII Predoctoral Fellowship from MSC (BF03-00201).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked advertisement in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

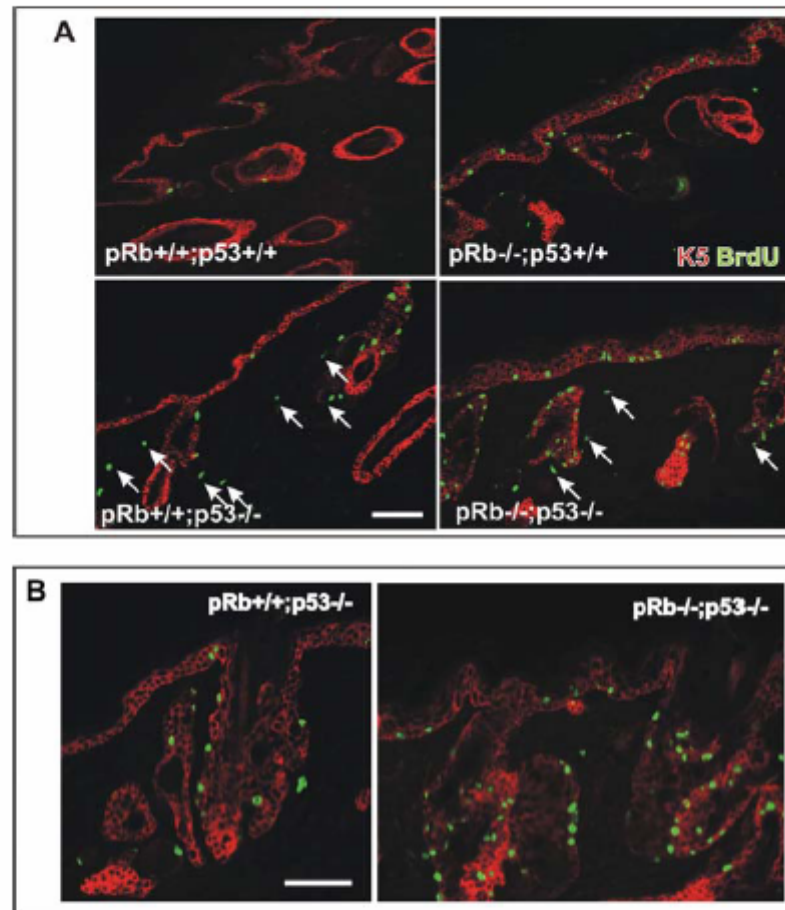
We thank Dr. A. Berns (Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, the Netherlands) for providing different mutant mice, Dr. P. Coulombe for the generous gift of anti-K17 antibody, Jesús Martínez and the personnel of the animal facility of CIEMAT for the excellent care of the animals, and Pilar Hernández (CIEMAT) for the histologic preparations.

References

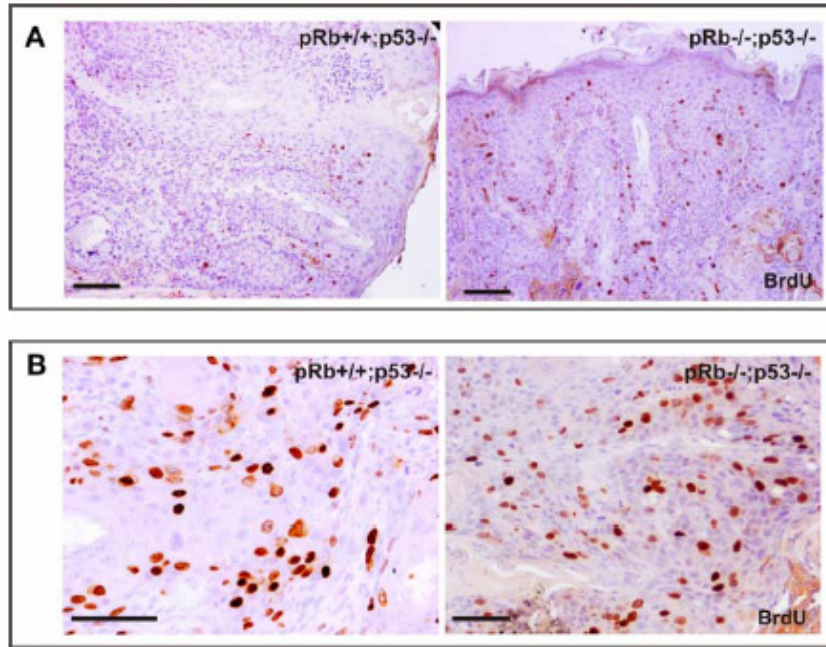
- Nickoloff BJ, Qin JZ, Chaturvedi V, Bacon P, Panella J, Denning MF. Life and death signaling pathways contributing to skin cancer. *J Invest Dermatol Symp Proc* 2002;27:27-35.
- Boukamp P. Non-melanoma skin cancer: what drives tumor development and progression? *Carcinogenesis* 2005;26:1657-67.
- Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature* 2000;408:307-10.
- Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 1995;81:323-30.
- Hickman ES, Moroni MC, Helin K. The role of p53 and pRb in apoptosis and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2002;12:60-6.
- Sherr CJ, McCormick F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* 2002;2:103-12.
- Brugarolas J, Bronson RT, Jacks T. p21 is a critical CDK2 regulator essential for proliferation control in Rb-deficient cells. *J Cell Biol* 1998;141:503-14.
- Brugarolas J, Moberg K, Boyd SD, Taya Y, Jacks T, Lees JA. Inhibition of cyclin-dependent kinase 2 by p21 is necessary for retinoblastoma protein-mediated G₁ arrest after γ -irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:1002-7.
- Dimri GP, Nakanishi M, Desprez PY, Smith JR, Campisi J. Inhibition of E2F activity by the cyclin-dependent protein kinase inhibitor p21 in cells expressing or lacking a functional retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol* 1996;16:2987-97.
- DeGregori J, Leone G, Miron A, Jakoi L, Nevins JR. Distinct roles for E2F proteins in cell growth control and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:7245-50.
- Bates S, Phillips AC, Clark PA, et al. p14ARF links the tumour suppressors RB and p53. *Nature* 1998;395:124-5.
- Russell JL, Powers JT, Rounbehler RJ, Rogers PM, Conti CJ, Johnson DG. ARF differentially modulates

- apoptosis induced by E2F1 and Myc. *Mol Cell Biol* 2002; 22:1360–8.
13. Tolbert D, Lu X, Yin C, Tantama M, Van Dyke T. p19(ARF) is dispensable for oncogenic stress-induced p53-mediated apoptosis and tumor suppression *in vivo*. *Mol Cell Biol* 2002;22:370–7.
14. Meuwissen R, Linn SC, Linnoila RI, Zevenhoven J, Mooi WJ, Bems A. Induction of small cell lung cancer by somatic inactivation of both Trp53 and Rb1 in a conditional mouse model. *Cancer Cell* 2003;4:181–9.
15. Shakhova O, Leung C, van Montfort E, Berns A, Marino S. Lack of Rb and p53 delays cerebellar development and predisposes to large cell anaplastic medulloblastoma through amplification of N-Myc and Ptc2. *Cancer Res* 2006;66:5190–200.
16. Zhou Z, Flesken-Nikitin A, Corney DC, et al. Synergy of p53 and Rb deficiency in a conditional mouse model for metastatic prostate cancer. *Cancer Res* 2006;66: 7889–98.
17. Ruiz S, Santos M, Segrelles C, et al. Unique and overlapping functions of pRb and p107 in the control of proliferation and differentiation in epidermis. *Development* 2004;131:2737–48.
18. Lara MF, Paramio JM. The Rb family connects with the Tp53 family in skin carcinogenesis. *Mol Carcinog* 2007;46:618–23.
19. Ruiz S, Santos M, Lara MF, Segrelles C, Ballester C, Paramio JM. Unexpected roles for pRb in mouse skin carcinogenesis. *Cancer Res* 2005;65:9678–86.
20. Ruiz S, Santos M, Paramio JM. Is the loss of pRb essential for the mouse skin carcinogenesis? *Cell Cycle* 2006;5:625–9.
21. Derksen PW, Liu X, Saridin F, et al. Somatic inactivation of E-cadherin and p53 in mice leads to metastatic lobular mammary carcinoma through induction of anoikis resistance and angiogenesis. *Cancer Cell* 2006;10:437–49.
22. Jonkers J, Meuwissen R, van der Gulden H, Peterse H, van der Valk M, Berns A. Synergistic tumor suppressor activity of BRCA2 and p53 in a conditional mouse model for breast cancer. *Nat Genet* 2001;29:418–25.
23. Marino S, Vooijs M, van Der Gulden H, Jonkers J, Bems A. Induction of medulloblastomas in p53-null mutant mice by somatic inactivation of Rb in the external granular layer cells of the cerebellum. *Genes Dev* 2000;14:994–1004.
24. Segrelles C, Ruiz S, Santos M, Martínez-Palacio J, Lara MF, Paramio JM. Akt mediates an angiogenic switch in transformed keratinocytes. *Carcinogenesis* 2004;25: 1137–47.
25. Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, et al. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 2003;4:249–64.
26. Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* 2003;19:185–93.
27. Vaquerizas JM, Conde L, Yankilevich P, et al. GEPAS, an experiment-oriented pipeline for the analysis of microarray gene expression data. *Nucleic Acids Res* 2005;33:W616–20.
28. Saeed AI, Sharov V, White J, et al. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* 2003;34:374–8.
29. Wijnhoven SW, Speksnijder EN, Liu X, et al. Dominant-negative but not gain-of-function effects of a p53.R270H mutation in mouse epithelium tissue after DNA damage. *Cancer Res* 2007;67:4648–56.
30. Segrelles C, Ruiz S, Perez P, et al. Functional roles of Akt signaling in mouse skin tumorigenesis. *Oncogene* 2002;21:53–64.
31. DiGiovanni J, Bol DK, Wilker E, et al. Constitutive expression of insulin-like growth factor-1 in epidermal basal cells of transgenic mice leads to spontaneous tumor promotion. *Cancer Res* 2000;60:1561–70.
32. Mason JM, Morrison DJ, Basson MA, Licht JD. Sprouty proteins: multifaceted negative-feedback regulators of receptor tyrosine kinase signaling. *Trends Cell Biol* 2006;16:45–54.
33. Bader AG, Kang S, Zhao L, Vogt PK. Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nat Rev Cancer* 2005;5:921–9.
34. Cully M, You H, Levine AJ, Mak TW. Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 2006;6:184–92.
35. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2002;2:489–501.
36. Segrelles C, Lu J, Hammann B, et al. Deregulated activity of Akt in epithelial basal cells induces spontaneous tumors and heightened sensitivity to skin carcinogenesis. *Cancer Res* 2007;67:10879–88.
37. Altomare DA, Testa JR. Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene* 2005;24: 7455–64.
38. Bellacosa A, Kumar CC, Di Cristofano A, Testa JR. Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting. *Adv Cancer Res* 2005;94:29–86.
39. Segrelles C, Moral M, Lara MF, et al. Molecular determinants of Akt-induced keratinocyte transformation. *Oncogene* 2006;25:1174–85.
40. Bolontrade MF, Stern MC, Binder RI, Zenklusen JC, Gimenez-Conti IB, Conti CJ. Angiogenesis is an early event in the development of chemically induced skin tumors. *Carcinogenesis* 1998;19:2107–13.
41. Ziegler A, Jonason AS, Leffell DJ, et al. Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature* 1994;372:773–6.
42. Greenhalgh DA, Wang XJ, Donehower LA, Roop DR. Paradoxical tumor inhibitory effect of p53 loss in transgenic mice expressing epidermal-targeted v-rasHa, v-fos, or human transforming growth factor α . *Cancer Res* 1996;56:4413–23.
43. Wang XJ, Greenhalgh DA, Jiang A, et al. Expression of a p53 mutant in the epidermis of transgenic mice accelerates chemical carcinogenesis. *Oncogene* 1998;17: 35–45.
44. Blanpain C, Fuchs E. Epidermal stem cells of the skin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2006;22:339–73.
45. Zhou Z, Flesken-Nikitin A, Nikitin AY. Prostate cancer associated with p53 and Rb deficiency arises from the stem/progenitor cell-enriched proximal region of prostatic ducts. *Cancer Res* 2007;67:5683–90.
46. Liu Y, Lyle S, Yang Z, Cotsarelis G. Keratin 15 promoter targets putative epithelial stem cells in the hair follicle bulge. *J Invest Dermatol* 2003;121:963–8.
47. Leis H, Segrelles C, Ruiz S, Santos M, Paramio JM. Expression, localization, and activity of glycogen synthase kinase β during mouse skin tumorigenesis. *Mol Carcinog* 2002;35:180–5.
48. Ferby I, Reschke M, Kudlacek O, et al. Mig6 is a negative regulator of EGF receptor-mediated skin morphogenesis and tumor formation. *Nat Med* 2006;12:568–73.
49. Sordella R, Bell DW, Haber DA, Settleman J. Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways. *Science* 2004;305:1163–7.
50. Shaw AT, Meissner A, Dowdle JA, et al. Sprouty-2 regulates oncogenic K-ras in lung development and tumorigenesis. *Genes Dev* 2007;21:694–707.
51. Toussaint-Smith E, Donner DB, Roman A. Expression of human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins in primary foreskin keratinocytes is sufficient to alter the expression of angiogenic factors. *Oncogene* 2004;23:2988–95.

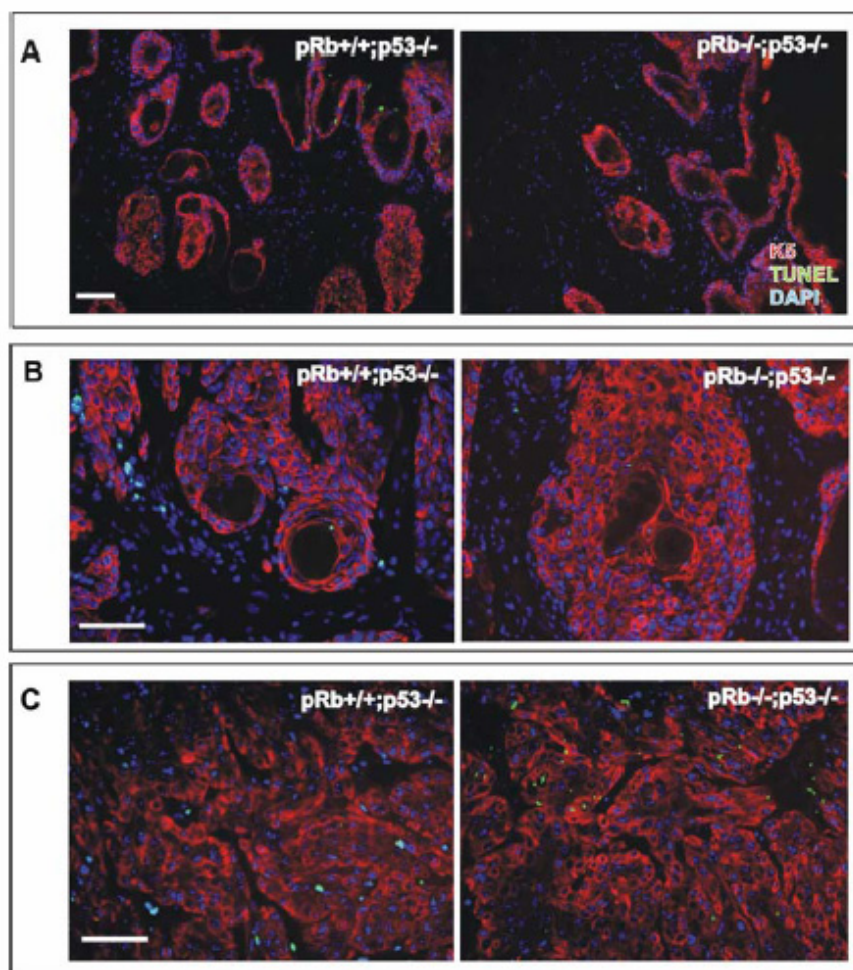
Supplementary Figures



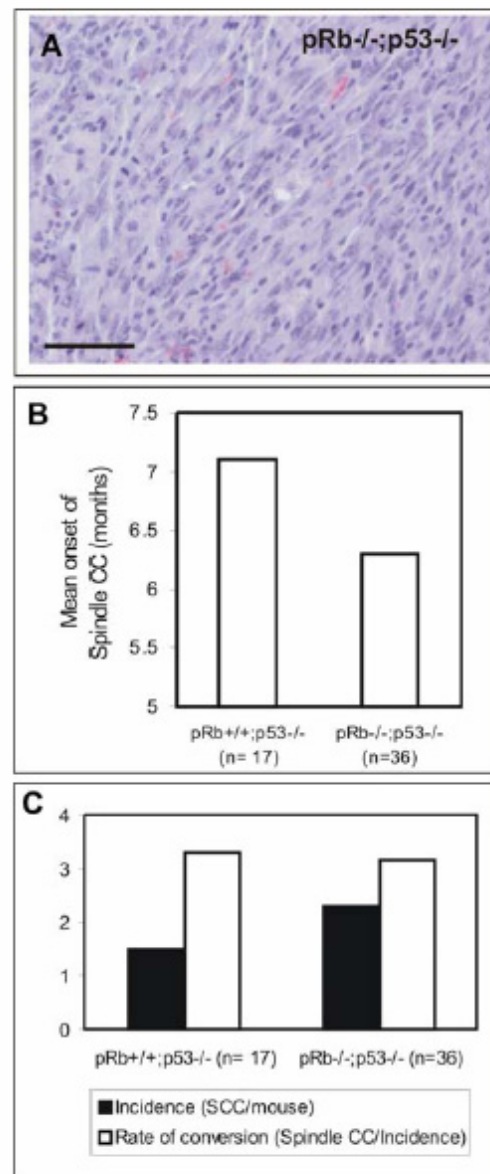
1) Supp Fig 1. Representative examples of the double immunofluorescence analysis showing the expression of K5 (red) and BrdU incorporation (green) in non lesional skin (A) and dysplastic hair follicles (B) of mice of the quoted genotypes. Arrows denote the BrdU incorporation in dermis of pRb^{+/+};p53^{-/-} and pRb^{-/-};p53^{-/-} mice. Note the increased labeling in lesional and dysplastic hair follicles of pRb^{-/-};p53^{-/-} mice. Bars = 100 μm



Supp Fig 2. Representative examples of the immunohistochemical analysis of BrdU incorporation in pRb^{+/+};p53^{-/-} (*Rb*^{wt/wt}; *Trp53*^{F1/F10}; *K14cre*) and pRb^{-/-};p53^{-/-} (*Rb*^{F19/F19}; *Trp53*^{F1/F10}; *K14cre*) spontaneous tumors at early (A) or advanced (B) stage. Bars = 150 μ m.



Supp Fig 3. Representative examples of the double immunofluorescence analysis showing the expression of K5 (red) and apoptosis (detected by TUNEL, green) in pRb^{+/+};p53^{-/-} (*Rb*^{wt/wt}; *Trp53*^{F1/F10}; *K14cre*) and pRb^{-/-};p53^{-/-} (*Rb*^{F19/F19}; *Trp53*^{F1/F10}; *K14cre*) non-lesional skin (A), dysplastic hair follicles (B) and spontaneous tumors (C) at advanced stage. Bars = 150 μ m.



Supp Fig 4. Epithelial mesenchymal transition analysis. A) Example of a Hematoxylin-eosin stained section of a highly aggressive spindle cell carcinoma isolated from pRb^{-/-};p53^{-/-} (*Rb*^{F19/F19}; *Trp53*^{F1/F10}; *K14cre*) mouse. B) Mean onset of spindle cell carcinomas in pRb^{+/+};p53^{-/-} (*Rb*^{wt/wt}; *Trp53*^{F1/F10}; *K14cre*) and pRb^{-/-};p53^{-/-} (*Rb*^{F19/F19}; *Trp53*^{F1/F10}; *K14cre*). C) Incidence of SCCs and rate of conversion into spindle cell carcinomas in pRb^{+/+};p53^{-/-} (*Rb*^{wt/wt}; *Trp53*^{F1/F10}; *K14cre*) and pRb^{-/-};p53^{-/-} (*Rb*^{F19/F19}; *Trp53*^{F1/F10}; *K14cre*) mice.

Spontaneous tumor formation in *Trp53*-deficient epidermis mediated by chromosomal instability and inflammation.

Authors:

Ana Belén Martínez-Cruz, Mirentxu Santos, Ramón García-Escudero, Marta Moral, Carmen Segrelles, Corina Lorz, Cristina Saiz, Águeda Buitrago-Pérez, Clotilde Costa, and Jesús M. Paramio¹

1 Corresponding author; Jesús M. Paramio, Molecular Oncology Unit, Division of Biomedicine, CIEMAT, Ave. Complutense 22, E-28040 Madrid, Spain (34) 913460865 jesusm.paramio@ciemat.es

ABSTRACT

Background: The specific ablation of *Trp53* gene in mouse epidermis leads to the spontaneous development of aggressive squamous cell carcinoma, a process that is accelerated by the subsequent loss of *Rb* gene.

Methods: The possible mechanisms leading to spontaneous tumor formation in epidermis in the absence of *Trp53* have been studied focusing on hair cycle defects, inflammation and possible chromosomal instability.

Results: Loss of p53 induces tumorigenesis primarily by mediating early chromosome instability (CIN) and, to a minor extent, NFκB activation. Notably, CIN occurs not only in p53-deficient skin, but also in epidermis lacking both *Rb* and *Trp53* tumor suppressor, indicating a predominant role of this process in spontaneous tumorigenesis.

Conclusions: These data identify chromosomal instability as a major mechanism in tumorigenesis originated by *Trp53* loss in stratified epithelia and imply that therapies aimed to counterbalance CIN might be of relevance for the treatment of human cancers bearing impaired p53 functions.

INTRODUCTION

The p53 tumor suppressor coordinates the cellular response to stress, including DNA damage, hypoxia, and oncogenic stress through transcriptional mechanisms, resulting in cell cycle arrest, senescence, or apoptosis. Accordingly, *Trp53* mutations are widely involved in human tumorigenesis [1]. Moreover, altered p53 functions are also associated with poor prognosis and high metastatic potential in human tumors [1, 2].

We and others have previously described that the specific ablation of p53 gene in stratified epithelia (*Trp53*lox;K14cre thereafter p53^{ΔEC} mice) leads to spontaneous squamous cell carcinoma (SCC) development [3, 4], in a process that is accelerated by the subsequent ablation of *Rb* gene [4]. Detailed analysis indicates that such acceleration, characterized by earlier tumor development, is mediated by increased activation of Akt pathway, resulting in increased proliferation and augmented tumor angiogenesis [4]. Nonetheless, the mechanisms leading to spontaneous tumor development by *Trp53* loss in epidermis remain largely unknown. To gain some insight on these mechanisms, we have recently performed functional genomic analysis of tumors arising in mice bearing the epidermal deletion of *Trp53* or *Rb* and *Trp53*

(García-Escudero et al., submitted). These studies revealed that these mouse tumors share relevant characteristics with multiple human malignancies distinguished by poor prognosis, altered p53 status and high metastatic potential (García-Escudero et al., submitted). Of note, these genomic alterations, which are independent on the pRb status, also revealed a primary involvement of cell cycle genes, in particular those implicated in mitosis, and a functional enrichment of stem cell associated genes (García-Escudero et al., submitted), in agreement with the hair follicle origin of the tumors [4].

Here we have performed a detailed analysis of the possible mechanisms leading to spontaneous tumor development in p53^{ΔEC} and their possible metastatic characteristics. We found that tumorigenesis is associated with premature mitotic aberrations leading to chromosome instability. Collectively, our findings indicate that targeted therapies aimed to restore the mitotic control would be of great benefit in the treatment of tumors bearing altered p53 functions.

MATERIALS AND METHODS

Mice and genotyping

Mice of the different genotypes in FVB background (Rb^{ΔEC}, p53^{ΔEC} and Rb^{ΔEC};p53^{ΔEC}) were genotyped as previously described [4]. Mice of all genotypes were monitored for tumor development and sacrificed for histopathological analyses. Rb^{ΔEC} and control mice were subjected to a DMBA/TPA chemical carcinogenesis protocol as described [5]. The animal experiments were approved by the Animal Ethical Committee and conducted in compliance with Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT) Guidelines.

Histological procedures

For histological analysis, skin and tumoral samples were fixed in formalin and embedded in paraffin prior to sectioning, or snap frozen in liquid nitrogen and embedded in OCT for cryosectioning. Sections of 5μm were cut and stained with H&E for pathology assessment. Paraffin sections were deparaffinized. All sections were incubated with 5% horse serum for 30 minutes to block the Fc receptor in tissue, and then washed three times with sterile PBS (pH 7.5) prior to incubation with the appropriate primary antibodies diluted in PBS/BSA. Antibodies were used as follows:

in frozen sections 1/50 dilution of FITC-mouse anti-mouse CD45.2 (Ly 5.2) (BD Pharmingen) for CD45 detection, FITC-rat anti-mouse CD11b (BD Pharmingen) for macrophage detection, FITC-rat anti-mouse Ly-6G and LY6C (BD Pharmingen) for granulocyte detection, and 1/1000 dilution of anti-K5 (Covance) for keratin 5 detection. In paraffin sections: 1/200 dilution of anti- γ Tubulin-centrosome marker (Abcam); 1/100 dilution of anti- α Tubulin for microtubules detection (Sigma); 1/50 dilution of P-Chk1 (S345) (Abcam) and P-Chk-2 (T68) (Abcam). FITC- or TexasRed-conjugated secondary antibodies for immunofluorescence were purchased from Jackson ImmunoResearch and used at 1/50 and 1/500, respectively. DAPI was used to counterstain the nuclei or chromosomes. Control slides were obtained by replacing primary antibodies with PBS (data not shown). The quantitative analyses of mitosis were performed using hematoxylin & eosin stained sections from at least five different mice/tumors scoring three to seven different sections. The total number of mitosis scored ranged from 150 to 500 for each data point. Double immunofluorescence stained sections against γ and α Tubulin scoring at least 150 mitotic figures for each data point. Data are shown as mean \pm SD.

Affymetrix mouse gene chip 430A analysis

Newborn skin samples were preserved in RNAlater (Ambion) and disrupted and homogenized using Mixer Mill MM301 (Retsch). Total RNA was extracted and purified from 30 mg of skin using RNeasy Fibrous Tissue Mini kit (Qiagen) following the manufacturers' recommendations. The integrity of the RNA populations was tested in the Bioanalyzer (Agilent) showing at least 1.4 28S to 18S ratio. Total RNA were hybridized at the Genomic Facility of the Centro de Investigación del Cáncer (Salamanca, Spain). We exported .cel files from Affymetrix GCOS software, and used the GEPAS analysis suit [6] to perform background subtraction with RMA [7], normalize the chips using the quantile method [8] and log2 transformed and mean-centered the intensity values. ANOVA analysis ($p < 0.01$), performed using the MeV software [9], was used to select 1435 genes differentially expressed among the quoted genotypes and control mice. The whole data sets are available at Gene Expression Omnibus database (GSE11990). The inflammation related genes shown in figure 2 were obtained by Gene Ontology using DAVID Functional Annotation tool.

Western blot analysis

Whole skin extracts were ground with a mortar on liquid nitrogen, homogenized and lysed by freeze-thawing cycles in lysis buffer C (200mM HEPES pH 7.9, 25% glycerol, 400mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1μg/mL aprotinin, 1μg/mL leupeptin, 1mM PMSF, 20mM NaF, 1mM NaPPi, 1mM Na₃VO₄, 2.5mM DTT), and centrifuged to obtain supernatants containing total protein. 35μg protein per sample were resolved in SDS-PAGE gels and transferred to nitrocellulose membranes (Amersham). Membranes were blocked with 5% non-fat milk diluted in TBS and incubated with the appropriate antibodies diluted in TBS-T 0.5% BSA. Antibodies were used as follows: anti-NFκBp65; anti-NFκBp50; anti-NFκBp52; anti-IKKα ; anti-IKKγ all diluted 1/250 and purchased from Santa Cruz ; anti-IκBα diluted 1/200 (Santa Cruz); anti-IKKβ diluted 1/1000 (IMGenex); anti-actin diluted 1/100 (Santa Cruz). Secondary antibodies were purchased from Jackson ImmunoResearch and used at 1/5000. Super Signal West Pico Chemiluminescence Substrate (Pierce) was used according to the manufacturer's recommendations to visualize the bands.

RESULTS

The absence of *Trp53* in stratified epithelia through cre-LoxP system (p53^{ΔEC} mice) leads to spontaneous tumor formation in mice through yet unknown mechanisms. To investigate the possible process involved in tumorigenesis we focused on three previously reported activities of p53, which are also involved in skin tumorigenesis. First, p53 is involved in hair cycle through catagen promotion [10]; second, p53 represses inflammatory response by interfering with NFκB-dependent transcription [11], and third, p53 prevents centrosome amplification and thus mitotic aberrations [12].

The possible involvement of p53 in tumorigenesis through interference with hair cycling would imply that processes leading to accelerated hair regrowth would also account for increased tumor development. To test this hypothesis, we performed repeated depilation and monitored tumor incidence in the treated areas. No increased number of tumors were observed in mice (n=10) under repeated depilation after 4 months compared with untreated mice or with depilated controls (not shown), thus

discarding hair cycle alterations as a main mechanism for tumor development in $p53^{\Delta EC}$ mice.

To analyze the involvement of inflammatory processes in tumor development we monitored the presence of inflammatory cells in non-lesional epidermis of control, $p53^{\Delta EC}$ and $p53^{\Delta EC};Rb^{\Delta EC}$ adult mice, as these two mouse models display high incidence of spontaneous tumor development in which the presence of such cells is a common characteristic [4]. We observed increased number of lymphocytes (CD45-positive), macrophages (Mac-1 positive) and granulocytes (Gr-1 positive) in $p53^{\Delta EC}$ mouse epidermis (Fig 1A', B', C'), compared to control epidermis (Fig 1A, B, C). Such increased number was not further augmented in $p53^{\Delta EC};Rb^{\Delta EC}$ skin (Fig 1A'', B'', C'') and only to a moderate extent in epidermal tumors (Fig 1A''', B''', C'''). These data suggest that the absence of *Trp53* is sufficient to elicit a proinflammatory response and recruit effector cells in epidermis prior to tumor development.

To further corroborate these results, we analyzed microarray data obtained from newborn mouse epidermis [4] in search for possible pro-inflammatory genes. This analysis (Fig 2A) indicates that there is a reduced number of genes that display increased expression in $p53^{\Delta EC}$ exclusively, whereas the vast majority of them display a pattern characterized either by augmented expression in $p53^{\Delta EC};Rb^{\Delta EC}$ mouse epidermis, or by a moderate increase in $p53^{\Delta EC}$ further increased in $p53^{\Delta EC};Rb^{\Delta EC}$. These data indicate that the absence of *Trp53* or, more importantly, the simultaneous absence of *Rb* and *Trp53* promote expression changes in multiple inflammation-related genes. Finally, given the relevance of the NF κ B pathway in regulating the expression of inflammatory genes, we analyzed the expression of proteins belonging to this pathway in mouse epidermis. We observed (Fig 2B) an increase in p65, p50 and IKK β in $p53^{\Delta EC}$ and $p53^{\Delta EC};Rb^{\Delta EC}$ samples, whereas no significant changes were observed in IKK α . Of note, the expression of p52 was decreased in all transgenic samples, and a moderate increase in IKK γ and a moderate decrease in I κ B α was only observed in $p53^{\Delta EC};Rb^{\Delta EC}$ mouse epidermis. Overall, these data indicate that the absence of p53 in epidermis triggers a pro-inflammatory response which is only partially dependent on NF κ B activation.

Since mutations in p53 promotes mitotic aberrations which may lead to spontaneous tumor development [13-15], we studied the presence of aberrant mitosis in p53^{ΔEC} and p53^{ΔEC};Rb^{ΔEC} mouse epidermis and tumors. Multiple mitotic aberrations were observed in epidermis (Fig 3A, B, E) and in epidermal tumors (Fig 3C, D, E), suggesting that deregulated mitotic progression could be responsible for spontaneous tumor development. We have previously reported that tumors arising in p53^{ΔEC} and p53^{ΔEC};Rb^{ΔEC} mice display a clear hair follicle origin [4], since proliferation, and thus mitosis, is augmented in these areas compared with interfollicular epidermis (Fig 3F), this may help to explain our previous data. Moreover, proliferation in hair follicles is dramatically increased by the loss of Rb (Fig 3F), which might act synergistically with *Trp53* loss to increase the number of mitotic aberration in p53^{ΔEC};Rb^{ΔEC} hair follicles, thus providing further support for the accelerated tumor formation observed in p53^{ΔEC};Rb^{ΔEC} mice [4]. Finally, to further support the involvement of *Trp53* loss in promoting mitotic aberrations in epidermis and thus favoring tumor development, we also monitored possible alterations in papillomas and SCCs arising upon chemical carcinogenesis protocols in Rb^{ΔEC} epidermis [5]. In this system, the development of papillomas is prevented by overactivation of p53-dependent pathways, leading to premature p53-loss of function and increased malignant conversion of papillomas in SCCs [5]. Rb-deficient malignant papillomas, which have lost p53 functions (pre-malignant), displayed a significant increase of aberrant mitosis, similar to that observed in Rb-deficient SCCs and exceeding that showed by SCCs developed in control mice (Fig 3G).

One of the control mechanisms exerted by p53, affecting mitotic control, is the centrosome duplication [12, 16], and multiple multipolar mitosis were observed in our above commented analysis (Fig 3B-D). Consequently, we monitored centrosome number in epidermis and tumors of p53^{ΔEC} mice. Although the majority of mitosis in nontumoral epidermis displayed a normal number of centrosomes (Fig 4A, C), we detected an increased number of centrosomes in both, non tumoral epidermis and epidermal tumors in p53^{ΔEC} mice (Fig 4A', B, C). These observations indicate that the altered mitosis in p53^{ΔEC} mouse epidermis and tumors were mediated, at least in part, by aberrant centrosome duplication and positioning. Importantly, such altered centrosome

number was associated with increased activation of mitotic checkpoints characterized by augmented expression of phosphorylated Chk1 and Chk2 (Fig 4D, D', respectively), in agreement with our previous findings of increased expression of mitotic controlling genes in tumors arising in p53-deficient epidermis (Garcia-Escudero et al., submitted). Collectively, the data presented here support the hypothesis that the spontaneous tumor development due to p53 absence is mediated by premature mitotic aberrations.

DISCUSSION

The p53 is one of the most frequently mutated tumor suppressor genes in human malignancies, and its loss of function is associated with poor prognosis and high metastatic potential in multiple human tumors [1, 2]. As a consequence, numerous efforts are directed to target the pathways affected by p53 loss as promising therapeutic alternatives [17]. Such efforts require the use of well suited preclinical models to assess the efficiency of such therapies in an in vivo setting. We and others have previously reported the spontaneous squamous cell carcinoma (SCC) development in p53^{ΔEC} mice [3, 4], and the collaboration of the subsequent ablation of Rb gene in the process [4]. Moreover, functional genomics analysis of the tumors compared with control epidermis revealed that the loss of p53 is the most relevant characteristic for tumor development, and that the molecular changes allowed the identification and classification of human tumors harboring p53 mutations, poor prognosis and high metastatic behavior (Garcia-Escudero et al., submitted). Consequently, these mice represent an attractive alternative for testing molecularly targeted therapies. In spite of this, the molecular bases of tumor development in p53^{ΔEC} mice are not well characterized. Here we focused on the three major mechanisms that might be relevant in the context of epidermis without external carcinogenic stimuli.

It is well assumed that most epidermal tumors arise in the hair follicle, probably in close relationship with epidermal stem cells ([18] Lorz et al., in press). Since p53 protein is suggested to act during catagen induction, the regression phase of the hair cycle [10], one may expect possible altered hair cycle and increased tumorigenesis in p53^{ΔEC} mice upon repeated depilation. However, in spite that spontaneous tumors arising in p53^{ΔEC} mice display a clear hair follicle origin [4], we did not find tumor development in the treated areas thus discarding that the possible hair cycle alterations resulted in increased

tumorigenesis. This can be explained if the functions of p53 can be carried by other proteins [19] and/or only in the context of complete p53 loss, affecting epidermal and dermal cells [10], these functions can be discerned.

It has been reported that mutated p53 expression correlates positively with NFκB activity in cultured cancer cells and that mutant p53 can elevate NFκB activity via transactivation of the NFκB2 gene, in particular in the context of SCC development [11, 20-23]. Our data add the functional characterization of proinflammatory cells prior to tumor development in mice bearing the epidermal specific deletion of *Trp53* (Fig 1). Furthermore, we find in newborn skin the expression of multiple genes involved in inflammatory response and deregulation of NFκB pathway proteins (Fig 2). These data highlight the possibility that inhibitors of inflammation, such as COX-2 inhibitors [24, 25] can be of use as anticancer therapies in mutant p53 bearing tumors.

Finally, we also analyzed possible premature chromosome instability in p53^{ΔEC} mouse. Chromosomal instability is an early event in SCC development [26-28] and the functions of p53 mediating proper mitotic progression are well recognized [29-31], therefore it is not surprising that the mutations in p53 promote mitotic aberrations leading to spontaneous tumor development [13, 14], which might be increased by Rb family inactivation [15]. Overall, our findings are in agreement with these observations, as we detect frequent aberrant mitosis in p53^{ΔEC} mouse tumors. Moreover, we also describe that such mitotic aberrations are frequent events prior to overt tumor development, thus reinforcing the oncogenic functions of chromosome instability. The observations that altered centrosome number also takes place prior to tumor formation also indicates that the functions of p53 controlling such process are essential for tumor suppressor activities. However, our data also seem to be in disagreement with the absence of centrosome aberrations in skin tumors promoted by Kras activation in p53^{ΔEC} mice [13]. Such apparent discrepancy can be explained by the use of an inducible cre system, the presence of Kras expression, or the induction of tumor formation by TPA treatment used by other authors [13]. Indeed, the spontaneous tumor development between Tp53^{ΔEC} and mice expressing the p53.R270H mutation is similar, and the differences are only appreciable upon UV carcinogenic stimuli [32].

Our data may also suggest that chromosome instability by complete loss of function, either by *Trp53* loss or dominant functions, may represent a more dramatic effect than

abrogating some specific p53 functions in oncogenesis. Indeed, the chromosomal instability observed in Rb^{ΔEC} mice upon two stage carcinogenesis leading to aggressive and poorly differentiated carcinomas [5, 33] is in contrast with the poorly aggressive and highly differentiated tumors arising in Rb^{ΔEC};p107^{-/-} mice [34], in which the absence, or reduced expression, of p107 abrogates the proapoptotic functions of p53 without affecting cell cycle [34, 35]. In support of this, a chromosomal instability signature represents a potential tool in determining malignancy and metastatic behavior over a broad range of human tumors [36], and the genomic analysis of p53^{ΔEC} tumors, which display clear parallelism with chromosomal instability, is also able to predict malignant and metastatic behavior of several human cancers (García-Escudero et al., submitted). Collectively, such observations indicate that p53^{ΔEC} mice can be an excellent tool for the preclinical evaluation of drugs targeted against mitotic regulators.

ACKNOWLEDGEMENTS

Grant support: Ministerio de Ciencia e Innovación grant SAF2008-00121; Comunidad Autónoma de Madrid Oncocycle Program grant S2006/BIO-0232, Ministerio de Ciencia e Innovación grant PS-090100-2006-3, and Ministerio de Sanidad y Consumo grant ISCIII-RETIC RD06/0020 (J.M. Paramio). We thank Dr. A. Berns [Netherlands Cancer Institute (NKI), Amsterdam, the Netherlands] for providing different mutant mice, Jesús Martínez and the personnel of the animal facility of CIEMAT for the excellent care of the animals, and Pilar Hernández (CIEMAT) for the histology preparations.

LEGEND TO FIGURES

Figure 1. Detection of inflammatory cells in frozen skin and tumor sections by double immunofluorescence with K5 (red) and CD45 as a leucocyte marker (green A), Mac-1 as a macrophage marker (green B) and Gr-1 as a granulocyte marker (green C) in control (A,B,C), p53^{ΔEC} (A', B', C'), Rb^{ΔEC};p53^{ΔEC} (A'',B'',C'') skin and tumors (A''', B''', C'''). An increase of the three markers is observed in Tp53^{ΔEC} and Rb^{ΔEC};p53^{ΔEC} skin. No further increase is observed in tumors. Bar=150μm

Figure 2. A) Heat map representation of inflammation related genes with differential expression in the quoted genotypes. B) Western blot analysis from non lesional skin samples of control, pRb^{ΔEC}, p53^{ΔEC} and pRb^{ΔEC};p53^{ΔEC} mice showing increased activation of the NFκB pathway in Trp53-deficient mice.

Figure 3. Hematoxylin-eosin stainings of rp53^{ΔEC} and pRb^{ΔEC};Trp53^{ΔEC} epidermis (A, B) and tumors (C,D) respectively, showing aberrant mitosis. E) Quantification of the percentage of aberrant mitosis in epidermis (control, Rb^{ΔEC}, Trp53^{ΔEC} and pRb^{ΔEC};rp53^{ΔEC}) and tumors (p53^{ΔEC} and pRb^{ΔEC};Trp53^{ΔEC}). F) Number of mitotic figures in interfollicular epidermis and hair follicles in the quoted genotypes. G) Quantification of the percentage of aberrant mitosis in Rb^{ΔEC} epidermis and papillomas and squamous cell carcinomas in control and Rb^{ΔEC} treated with DMBA/TPA. Bars = 10μm

Figure 4. Mitotic centrosomes in p53^{ΔEC} epidermis, showing normal (A) and abnormal (A') centrosome numbers, and p53^{ΔEC} tumors (B). C) Quantification of the percentage of mitosis referred to the number of centrosomes in pretumoral skin and tumors (n denotes the total number of mitoses scored). Detection of the phosphorylated mitotic checkpoint proteins P-Chk-1 (D) and P-Chk-2 (D') (red) by double immunofluorescence with α-tubulin (green). DAPI was used to counterstain nuclei and chromosomes. Bars = 10μm.

REFERENCES

1. Petitjean, A., et al., Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. Hum Mutat, 2007. 28(6): p. 622-9.
2. Toledo, F. and G.M. Wahl, Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. Nat Rev Cancer, 2006. 6(12): p. 909-23.
3. Jonkers, J., et al., Synergistic tumor suppressor activity of BRCA2 and p53 in a conditional mouse model for breast cancer. Nat Genet, 2001. 29(4): p. 418-25.
4. Martinez-Cruz, A.B., et al., Spontaneous squamous cell carcinoma induced by the somatic inactivation of retinoblastoma and Trp53 tumor suppressors. Cancer Res, 2008. 68(3): p. 683-92.

5. Ruiz, S., et al., Unexpected roles for pRb in mouse skin carcinogenesis. *Cancer Res*, 2005. 65(21): p. 9678-86.
6. Vaquerizas, J.M., et al., GEPAS, an experiment-oriented pipeline for the analysis of microarray gene expression data. *Nucleic Acids Res*, 2005. 33(Web Server issue): p. W616-20.
7. Irizarry, R.A., et al., Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics*, 2003. 4(2): p. 249-64.
8. Bolstad, B.M., et al., A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics*, 2003. 19(2): p. 185-93.
9. Saeed, A.I., et al., TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques*, 2003. 34(2): p. 374-8.
10. Botchkarev, V.A., et al., p53 Involvement in the control of murine hair follicle regression. *Am J Pathol*, 2001. 158(6): p. 1913-9.
11. Komarova, E.A., et al., p53 is a suppressor of inflammatory response in mice. *Faseb J*, 2005. 19(8): p. 1030-2.
12. Fukasawa, K., et al., Abnormal centrosome amplification in the absence of p53. *Science*, 1996. 271(5256): p. 1744-7.
13. Caulin, C., et al., An inducible mouse model for skin cancer reveals distinct roles for gain- and loss-of-function p53 mutations. *J Clin Invest*, 2007. 117(7): p. 1893-1901.
14. Wang, X.J., et al., Expression of a p53 mutant in the epidermis of transgenic mice accelerates chemical carcinogenesis. *Oncogene*, 1998. 17(1): p. 35-45.
15. Duensing, A. and S. Duensing, Guilt by association? p53 and the development of aneuploidy in cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. 331(3): p. 694-700.
16. Fukasawa, K., P53, cyclin-dependent kinase and abnormal amplification of centrosomes. *Biochim Biophys Acta*, 2008. 1786(1): p. 15-23.
17. Lane, D.P., Exploiting the p53 pathway for the diagnosis and therapy of human cancer. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2005. 70: p. 489-97.
18. Owens, D.M. and F.M. Watt, Contribution of stem cells and differentiated cells to epidermal tumours. *Nat Rev Cancer*, 2003. 3(6): p. 444-51.
19. Seiberg, M., J. Marthinuss, and K.S. Stenn, Changes in expression of apoptosis-associated genes in skin mark early catagen. *J Invest Dermatol*, 1995. 104(1): p. 78-82.
20. Ferris, R.L. and J.R. Grandis, NF-kappaB gene signatures and p53 mutations in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2007. 13(19): p. 5663-4.

21. Weisz, L., et al., Mutant p53 enhances nuclear factor kappaB activation by tumor necrosis factor alpha in cancer cells. *Cancer Res*, 2007. 67(6): p. 2396-401.
22. Scian, M.J., et al., Tumor-derived p53 mutants induce NF-kappaB2 gene expression. *Mol Cell Biol*, 2005. 25(22): p. 10097-110.
23. Gulati, A.P., et al., Mutant human tumor suppressor p53 modulates the activation of mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappaB, but not c-Jun N-terminal kinase and activated protein-1. *Mol Carcinog*, 2006. 45(1): p. 26-37.
24. Benoit, V., et al., Transcriptional activation of cyclooxygenase-2 by tumor suppressor p53 requires nuclear factor-kappaB. *Oncogene*, 2006. 25(42): p. 5708-18.
25. de Moraes, E., et al., Cross-talks between cyclooxygenase-2 and tumor suppressor protein p53: Balancing life and death during inflammatory stress and carcinogenesis. *Int J Cancer*, 2007. 121(5): p. 929-37.
26. Slaga, T.J., et al., Critical genetic determinants and molecular events in multistage skin carcinogenesis. *Symp Fundam Cancer Res*, 1986. 39: p. 31-44.
27. Aldaz, C.M., et al., Sequential development of aneuploidy, keratin modifications, and gamma-glutamyltransferase expression in mouse skin papillomas. *Cancer Res*, 1988. 48(11): p. 3253-7.
28. Aldaz, C.M., et al., Cytogenetic profile of mouse skin tumors induced by the viral Harvey- ras gene. *Carcinogenesis*, 1988. 9(8): p. 1503-5.
29. Tomasini, R., T.W. Mak, and G. Melino, The impact of p53 and p73 on aneuploidy and cancer. *Trends Cell Biol*, 2008. 18(5): p. 244-52.
30. Fukasawa, K., Centrosome amplification, chromosome instability and cancer development. *Cancer Lett*, 2005. 230(1): p. 6-19.
31. Tarapore, P. and K. Fukasawa, p53 mutation and mitotic infidelity. *Cancer Invest*, 2000. 18(2): p. 148-55.
32. Wijnhoven, S.W., et al., Dominant-Negative but not Gain-of-Function Effects of a p53.R270H Mutation in Mouse Epithelium Tissue after DNA Damage. *Cancer Res*, 2007. 67(10): p. 4648-56.
33. Ruiz, S., M. Santos, and J.M. Paramio, Is the loss of pRb essential for the mouse skin carcinogenesis? *Cell Cycle*, 2006. 5(6): p. 625-9.
34. Lara, M.F., et al., p107 acts as a tumor suppressor in pRb-deficient epidermis. *Mol Carcinog*, 2008. 47(2): p. 105-13.
35. Santos, M., et al., Susceptibility of pRb-deficient epidermis to chemical skin carcinogenesis is dependent on the p107 allele dosage. *Mol Carcinog*, 2008. 47(11): p. 815-21.

36. Carter, S.L., et al., A signature of chromosomal instability inferred from gene expression profiles predicts clinical outcome in multiple human cancers. Nat Genet, 2006. 38(9): p. 1043-8.

Figure 1.

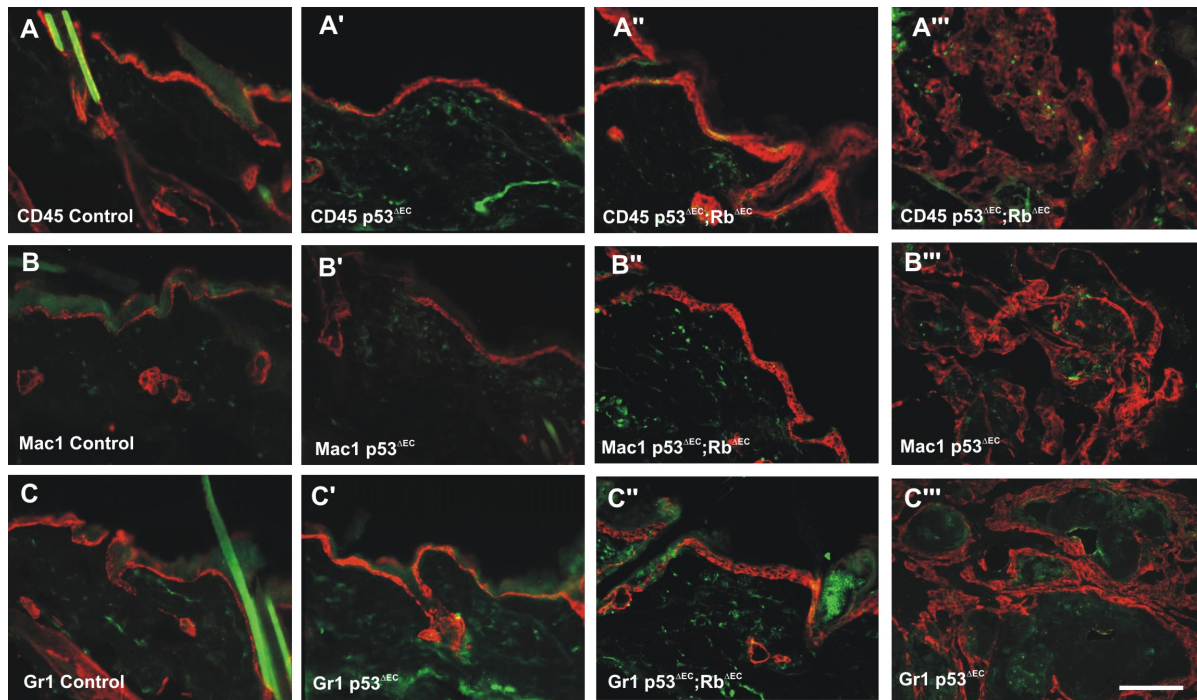


Figure 2.

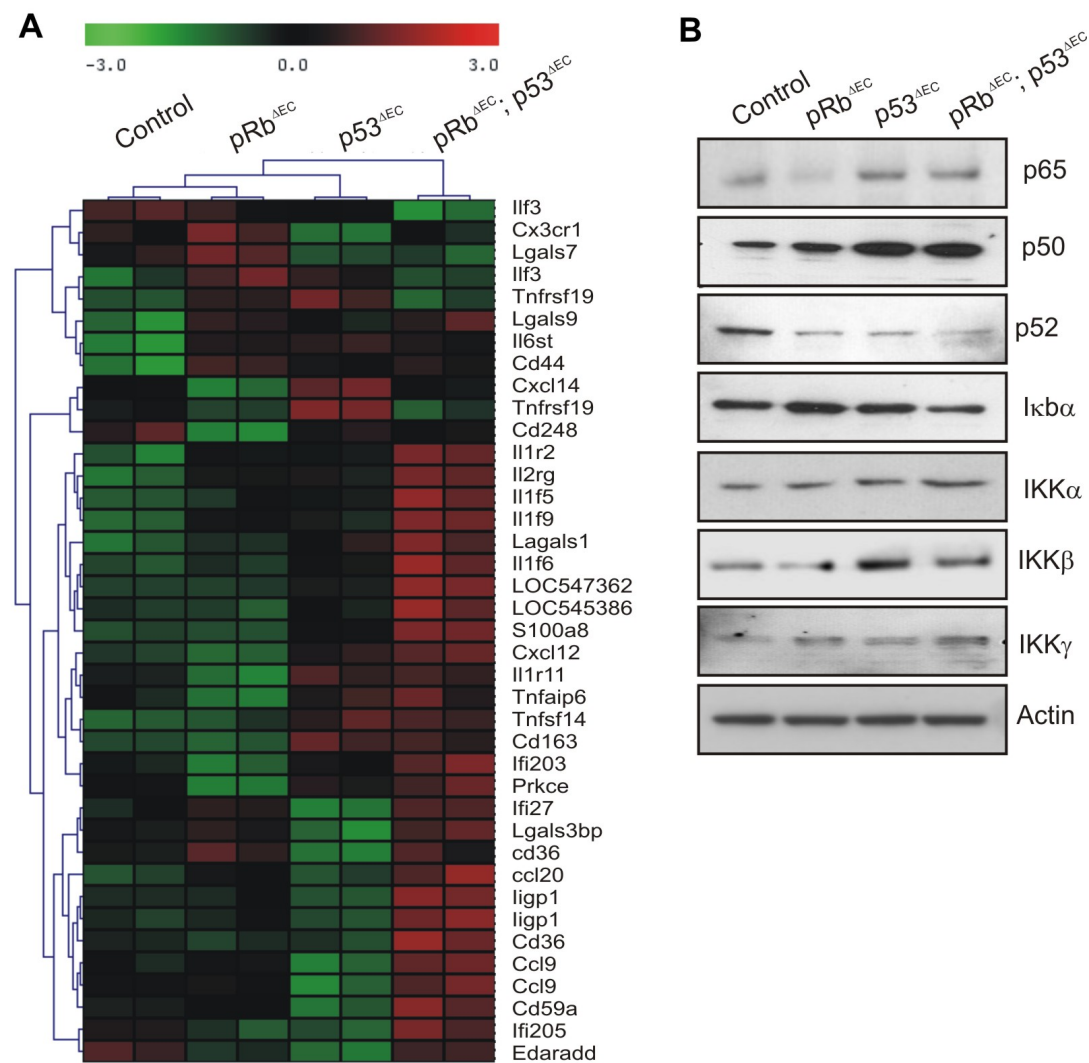


Figure 3.

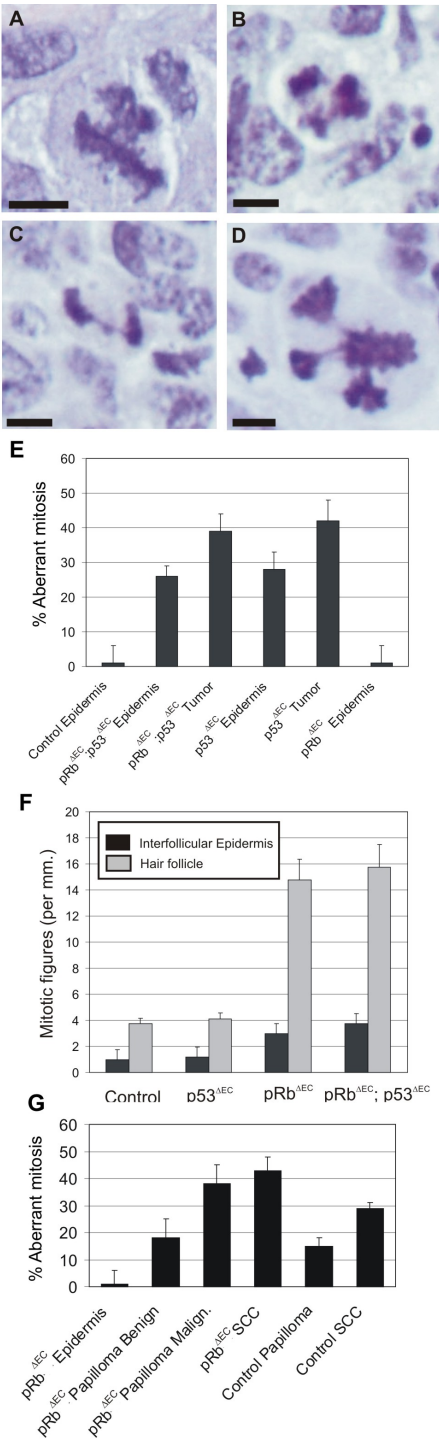


Figure 4.

